

**IN VITRO - UNTERSUCHUNGEN
ZUR BAKTERIZIDIE NEUER CEPHALOSPORINE
GEGENÜBER NEISSERIA GONORRHOEAE
IN DER FLÜSSIGPHASE**

MARKUS WOLFGANG OLLERT

1987

Disbui. München



Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco

**In vitro-Untersuchungen
zur Bakterizidie neuer Cephalosporine
gegenüber *Neisseria gonorrhoeae* in der Flüssigphase**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von:
Markus Wolfgang Ollert
aus Forchheim
München 1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H.C. Korting

Mitberichterstatter: 1.Prof. Dr. Dr.h.c. O. Braun-Falco
2.Prof. Dr. G. Ruckdeschel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. H.C. Korting

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der
mündlichen Prüfung: 08. Oktober 1987

	Inhaltsverzeichnis.....	1
1	Einleitung.....	3
1. 1	Einführung.....	3
1. 2	Dynamische In vitro-Modelle.....	4
1. 3	Probleme in der Gonorrhoe-Therapie.....	7
2	Problemstellung.....	9
2. 1	Entwicklung des verwendeten Modells.....	9
2. 2	Mathematische Beschreibung des Modells.....	10
2. 3	Verschiedene Einsatzmöglichkeiten des Modells.....	14
2. 3. 1	Simulation von Plasmaspiegeln.....	14
2. 3. 2	Simulation von Gewebsspiegeln.....	15
2. 3. 3	Untersuchungen zur optimalen Therapieform der Gonorrhoe.....	15
2. 3. 4	Dosisfindung in der Einmaltherapie der Gonorrhoe.....	16
3	Material und Methodik.....	17
3. 1	Flüssigmedium.....	17
3. 2	Antibiotika.....	19
3. 3	Bakterienstämme.....	21
3. 4	Versuchsaufbau.....	22
3. 5	Berechnung der Versuchsparameter.....	24
3. 5. 1	Cefotiam-Plasmaspiegel.....	25
3. 5. 2	Cefotiam-Gewebsspiegel.....	27
3. 5. 3	Niedrige kontinuierliche Spiegel vs. kurzanhaltende Spitzenspiegel von Cefotiam.....	27
3. 5. 4	Ceftriaxon-Konzentrationsverläufe.....	30
3. 6	Methodischer Versuchsaufbau.....	34
3. 7	Keimzahlbestimmung.....	36
3. 8	Antibiotikumkonzentrationsbestimmung.....	37

4	Ergebnisse.....	39
4. 1	Vergleich zwischen Trübungsmessung und Lebendkeimzahlbestimmung.....	39
4. 2	Leerversuche.....	40
4. 3	Einflüsse unterschiedlicher Cefotiamkonzentrationen auf <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	42
4. 4	Gonozide Wirkung verschiedener Ceftriaxon-Plasmakonzentrationen.....	50
4. 5	Ergebnisse der Antibiotikumkonzentrationsbestimmung..	53
5	Diskussion.....	54
5. 1	Bakterizide Wirkung von Cefotiam gegenüber <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	54
5. 2	Gonozide Wirkung unterschiedlicher Ceftriaxon-Plasmakonzentrationen.....	58
6	Zusammenfassung.....	61
7	Literaturverzeichnis.....	63
8	Danksagung.....	72
9	Lebenslauf.....	73
	Verzeichnis der Tabellen.....	74
	Verzeichnis der Abbildungen.....	75

1 Einleitung

1. 1 Einführung

Seit Beginn der Epoche der antimikrobiellen Chemotherapie bestand stets das Bestreben, die klinische Wirksamkeit eines Antibiotikums durch labortechnische Methoden möglichst präzise vorhersagen zu können [20]. Besonders Therapieschemata wie die Einmaltherapie der Gonorrhoe verlangen eine genaue Kenntnis der antimikrobiellen Wirksamkeit einer Substanz gegenüber dem Erreger in Hinblick auf die Absicherung des Behandlungserfolges. Mit der Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) hat sich ein im Laufe der Jahre bewährter und routinemäßig eingesetzter Parameter zur Beurteilung der antibakteriellen Aktivität eines Antibiotikums herauskristallisiert [79].

Jedoch besitzt das Verfahren der MHK-Bestimmung gewisse Grenzen in der Aussagefähigkeit: es ist ein statisches Verfahren, das bedeutet, die Erreger sind über die Dauer von mindestens 18 Stunden einer stets gleichbleibenden Antibiotikumkonzentration ausgesetzt [16]. Dies entspricht keineswegs den dynamischen, in Abhängigkeit von den pharmakokinetischen Eigenschaften sich ständig ändernden Antibiotikumkonzentrationen am Ort der Infektion im menschlichen Organismus [48, 79]. Dieser Tatsache trug die Entwicklung verschiedenster dynamischer In vitro-Modelle Rechnung, von denen die wichtigsten im Abschnitt 1. 2 kurz vorgestellt werden.

1. 2 Dynamische In vitro-Modelle

Das Ziel aller dynamischen Modelle ist es, die am Menschen auftretenden Verhältnisse möglichst genau nachzuvollziehen. Dies gilt vor allem im Hinblick auf eine exakte Simulation der pharmakokinetischen Eigenschaften eines Antibiotikums. Diese für jedes Antibiotikum spezifischen Eigenschaften sind die Grundlage für die in der Zeiteinheit sich ständig ändernden Antibiotikumkanzenrationen.

Grundsätzlich lassen sich entsprechend der Funktionsweise zwei Arten von In vitro-Modellen unterscheiden: zum einen Modelle, die nach dem Verdunnungsprinzip arbeiten, und zum anderen solche, denen ein Diffusions- bzw. Dialyseprozess zugrunde liegt [27].

Modelle auf der Basis des Verdunnungsprinzips

Eines der ersten wichtigen In vitro-Modelle war das von O'Grady und Pennington im Jahre 1966 [53] beschriebene Modell zur Simulation einer akuten unkomplizierten Zystitis, welches in modifizierter Form [29] als völlig automatisiertes System die renale Exkretion von Antibiotika zu simulieren vermag. Das Bakterienwachstum wurde photometrisch bestimmt.

Das erste Modell, welches annähernd die Simulation von Plasmaspiegeln eines Antibiotikums erlaubte, wurde von Sanfilippo und Morvillo 1968 beschrieben [61]. Der entscheidende Nachteil jedoch war, daß die Verdunnung nicht konstant erfolgte, wodurch die Antibiotikumkanzenration sich nicht exponentiell veränderte wie es in vivo der Fall ist.

Einen ähnlichen Nachteil hatte das von Nishida et al. (1976) [51, 52] beschriebene Modell. Ein schrittweiser, manuell gesteuerter Verdunnungsprozess erlaubte nur eine möglichst

genaue Annäherung, nicht aber eine exakte Simulation der In vivo-Situation.

Einen wesentlichen Fortschritt stellte das von Rowe und Morozowich (1969) [59] zuerst beschriebene und später von Grasso et al. (1978) [28] adaptierte Modell dar. Auf der Basis eines offenen Einkompartiment-Modells erlaubte es erstmals die exakte Simulation der Antibiotikumkanzenzentrationsverläufe wie sie beim Menschen nach einmaliger intramuskulärer Injektion beobachtet werden. Nicht zuletzt auch aufgrund des relativ geringen technischen Aufwandes und der trotzdem gegebenen hohen wissenschaftlichen Aussagefähigkeit wurde dieses Modell in der Folge von mehreren Zentren eingesetzt [30, 71, 77, 78, 80]. Auch für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche wurde das Modell nach Grasso adaptiert (Beschreibung siehe Abschnitte 2 und 3).

Auf ähnlicher Grundlage basierte auch das von Bergan et al. (1980) entwickelte Modell [5, 6]. Die simulierten Antibiotikumkanzenzentraktionen nahmen jedoch im Gegensatz zum Grasso-Modell kontinuierlich ab, außerdem wurden die Proben direkt aus dem Kulturgefäß entnommen und die Keimzahl photometrisch bestimmt.

Der technischen Apparatur des Grasso-Modells war auch das Modell nach Murakawa et al. (1980) ähnlich [50], welches auf der Basis eines offenen pharmakokinetischen Zweikompartiment-Modells die Simulation von Antibiotikumkanzenzeln nach intravenöser Bolusinjektion ermöglichte.

In allen bis dato erwähnten Modellen kam es neben einer Verdünnung des Antibiotikums auch zu einer kontinuierlichen Ausschwemmung von Bakterien. Daher wurden in der Folge auch Modelle entwickelt, welche mit Hilfe eines Filters ein Ausschwemmen der Keime verhinderten. Das wichtigste Beispiel hierfür ist das von Shah (1980) beschriebene Modell [65, 66, 67], welches bis auf das Filter den von Grasso und Bergan

beschriebenen Modellen im Prinzip ähnlich ist. Anzumerken ist jedoch, daß das Filter ein Ausschwemmen der Keime nicht hundertprozentig verhindert [68].

Modelle auf Diffusions- bzw. Dialysebasis

Al Asadi et al. (1979) [1] lieferten eine der ersten Beschreibungen eines Diffusionsmodells, bei dem zu Versuchsbeginn eine bakterienhaltige, antibiotikumfreie Seite von einer bakterienfreien, antibiotikumhaltigen durch eine Membran abgetrennt war. Entlang dieser Membran fanden die Diffusionsprozesse statt, leider mit dem Nachteil, daß die Poren der Membran relativ frühzeitig durch Bakterienmaterial verstopft wurden.

Von den Modellen, die nach dem Dialyseprinzip arbeiten, seien hier besonders die Modelle von Drugeon et al. (1979) und Pothier et al. (1981) erwähnt [17, 56]. In beiden Fällen wird antibiotikum- und bakterienhaltiges Nährmedium an einer Dialysemembran, welche nur für das Antibiotikum durchlässig ist, vorbeigepumpt. Dadurch kommt es zu einer kontinuierlichen Verdünnung der Antibiotikumlösung.

Abschließend sei noch das von Zinner (1981) entwickelte Kapillarmodell erwähnt [84], in welchem eine künstliche Kapillareinheit, die von bakterienhaltigem Medium umgeben war, von antibiotikumhaltigen Medium durchströmt wurde. Während das Antibiotikum in die bakterienhaltige Kammer übertreten konnte, war der umgekehrte Weg für die Bakterien verschlossen. Die Verdünnung des Antibiotikums erfolgte nicht kontinuierlich.

1. 3 Probleme in der Gonorrhoe-Therapie

Mit der Einführung des β -Laktam-Antibiotikums Penizillin in die Therapie der Gonorrhoe in den vierziger Jahren dieses Jahrhunderts wurde auf Jahrzehnte hin ein Durchbruch erzielt. So lag in den frühen siebziger Jahren die Heilungsrate der unkomplizierten Gonorrhoe nach Einmalgabe von Penizillin mit 97% noch immer in einem akzeptablen Bereich, wie eine multizentrische Therapiestudie in den USA ergab [38]. Erst Mitte der siebziger Jahre wurden erstmals Stämme isoliert, welche aufgrund ihrer Plasmid-gebundenen β -Laktamase-Bildung Penizillin-resistent waren [55]. In der Folge traten auch nicht β -Laktamase-produzierende Gonokokkenstämme mit chromosomal gebundener Penizillinresistenz zunächst im Fernen Osten, später in anderen Teilen der Welt verstärkt auf [9, 23]. Diese Entwicklung machte auch vor Europa nicht halt [21], weshalb sich die Notwendigkeit ergab, Alternativen zu Penizillin zu entwickeln, auch mit dem Ziel, die unkomplizierte Gonorrhoe möglichst mit einer Einmaltherapie sicher zur Ausheilung zu bringen.

In Betracht kamen dabei andere Vertreter aus der Klasse der β -Laktam-Antibiotika, deren Vorläufer in der Gonorrhoe-Therapie schon teilweise eingesetzt worden waren [47, 70], nämlich die neuen Cephalosporine. Frühe Untersuchungen dieser Substanzen ergaben nicht nur eine hervorragende In vitro-Wirksamkeit [41, 43, 44, 69, 74, 82], sondern auch eine gute Bioverfügbarkeit nach einmaliger intramuskulärer Applikation [15, 42, 45] wie auch optimale Heilungsraten in ersten klinischen Studien [22, 25, 32, 35, 44; 83].

In den vorliegenden Untersuchungen sollen die neuen Cephalosporine Cefotiam und Ceftriaxon in ihrer bakteriziden Wirkung gegenüber *Neisseria gonorrhoeae* näher betrachtet werden, vor allem auch unter Einbeziehung ihres pharmakokinetischen Verhaltens.

2 Problemstellung

2.1 Entwicklung des verwendeten Modells

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, aus der Fülle der in Abschnitt 1. 2 beschriebenen Modelle eines auszuwählen, das für die In vitro-Untersuchung der bakteriziden Wirkung neuer Cephalosporine gegenüber *Neisseria gonorrhoeae* geeignet erschien, und es auf einige aktuelle Fragen in der Chemotherapie der Gonorrhoe anzuwenden.

Die Wahl fiel dabei auf das Grasso-Modell (1978) [28]. Dies geschah zum einen aufgrund der benötigten relativ einfachen, nahezu in jedem gut ausgestatteten bakteriologischen Labor verfügbaren technischen Hilfsmittel [71]; zum anderen hatte das Modell von allen in der Literatur vorgestellten die weiteste Verbreitung gefunden, weshalb von Beginn an sehr gute Vergleichsmöglichkeiten bestanden [30, 39, 64, 71, 72, 77, 78, 79, 80].

Zunächst mußte ein für die Langzeitkultur von *Neisseria gonorrhoeae* geeignetes flüssiges Nährmedium gefunden werden. In zahlreichen Vorversuchen erwies sich dabei die Bouillon nach Morse (1976) [49], deren genaue Zusammensetzung in Abschnitt 3. 1 angegeben ist, als ideal. Für die Keimzahlbestimmung zeigte sich die Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) der photometrischen Trübungsmessung überlegen (siehe Abschnitt 4.1). Auch der in der Literatur häufiger geäußerte Nachteil des Grasso-Modells, daß nicht nur das Antibiotikum, sondern auch die Keime kontinuierlich ausgeschwemmt werden [27, 50, 65], konnte durch die Tatsache, daß die zu untersuchenden

Stämme von *Neisseria gonorrhoeae* in Vorversuchen unter statischen wie auch dynamischen Bedingungen ein ähnlich gutes Wachstum zeigten, als nicht relevant vernachlässigt werden (siehe Abschnitt 4. 2).

2. 2 Mathematische Beschreibung des Modells

Mathematische Grundlage des Grasso-Modells ist ein offenes pharmakokinetisches Einkompartimentmodell [26, 28, 59] mit Absorption und Elimination (Abb. 1). Aus dem Eingangskompartiment B, das am Modell Mensch dem Muskel entspricht, erfolgt die Invasion des Antibiotikums in das Blutplasma, welches in Abb. 1 durch das Kompartiment A dargestellt ist. Aus letzterem wird das Antibiotikum nach einer bestimmten Gesetzmäßigkeit wieder eliminiert, was dem Vorgang der Evasion entspricht.

Die Vorgänge der Invasion und der Evasion bei der Analyse von Blutspiegelverläufen nach intramuskulärer Applikation eines Antibiotikums lassen sich durch je eine Exponentialfunktion ausdrücken. Die Invasion des Antibiotikums in das Blutplasma folgt der Differentialgleichung:

$$dy / dt = k_a (y^0 - y) \quad [Gl. 1]$$

wobei dy/dt die Zunahmegeschwindigkeit des Plasmaspiegels, k_a die Absorptionskonstante, y^0 die fiktive Anfangskonzentration zum Zeitpunkt t_0 und y die Konzentration zu jedem beliebigen Zeitpunkt t ist. Durch Integration dieser Differentialgleichung ergibt sich:

$$y = y^0 (1 - e^{-k_a t}) \quad [Gl. 2]$$

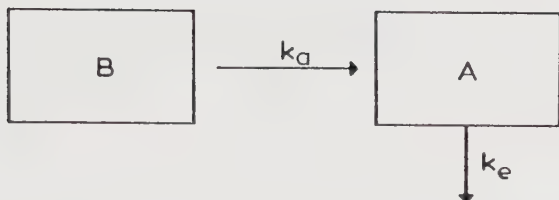


Abb. 1. Offenes pharmakokinetisches Einkompartimentmodell mit Eingangskompartiment B und zentralen Kompartiment A (k_a : Absorptionskonstante; k_e : Eliminationskonstante).

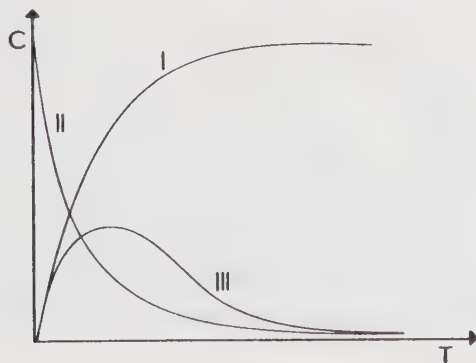


Abb. 2. Graphische Darstellung der reinen Invasion (I), der reinen Elimination (II) und der Bateman-Funktion (III) bei gleichzeitig stattfindender Invasion und Elimination.

Diese Gleichung gibt den zeitlichen Konzentrationsverlauf bei reiner Invasion wieder. Die entsprechende graphische Funktion wird in Abb. 2 durch die Kurve I repräsentiert.

Bei isolierter Betrachtung des Eliminationsvorgangs läßt sich folgende Differentialgleichung aufstellen:

$$dy / dt = - k_e \cdot y \quad [Gl. 3]$$

k_e ist die Eliminationskonstante. Wiederum durch Integration ergibt sich:

$$y = y^0 \cdot e^{-k_e t} \quad [Gl. 4]$$

Diese Exponentialgleichung beschreibt den Vorgang der reinen Elimination eines Pharmakons aus dem Blutplasma. Die graphische Darstellung dieser Funktion läßt sich aus Kurve II der Abb. 2 ansehen. Durch Umformung von Gleichung 4 leitet sich die Formel zur Errechnung der Eliminationshalbwertszeit $t_{1/2}$ her:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_e \quad [Gl. 5]$$

Wenn die Vorgänge der Invasion und Elimination gleichzeitig ablaufen, so ergeben sich Blutspiegelverläufe, die mathematisch durch die sogenannte Bateman-Funktion beschrieben werden können. Diese wurde ursprünglich von Bateman zur Formulierung des radioaktiven Zerfalls einer Substanz in ebenfalls zerfallende Tochtersubstanzen entwickelt. Ihre Herleitung läßt sich unter Hinzuziehung von Abb. 1 entwickeln. Für die Abnahmegeschwindigkeiten der Mengen B im Muskelkompartiment und A im Plasmakompartiment gilt folgendes:

$$dB / dt = -k_a \cdot B \quad [Gl. 6]$$

$$dA / dt = +ka \cdot B - ke \cdot A \quad [Gl. 7]$$

Aus Gleichung 6 folgt analog zu den Gleichungen 3 und 4 :

$$B = B^0 \cdot e^{-k_{el}t}$$

das heißt, die Antibiotikumkonzentration im Kompartiment B fällt exponentiell ab. Setzt man diesen Ausdruck in Gleichung 7 ein, so erhält man folgende Differentialgleichung:

$$dA / dt = ka \cdot B^0 \cdot e^{-k_{el}t} - ke \cdot A \quad [Gl. 8]$$

Ihre Lösung erfolgt mit Hilfe der Methode des integrierenden Faktors und liefert schließlich die Bateman-Funktion, welche den Konzentrationsverlauf eines Antibiotikums im Kompartiment A in Abhängigkeit von der Zeit beschreibt:

$$y = y^0 \cdot ka / (ka - ke) \cdot (e^{-k_{el}t} - e^{-k_{ex}t}) \quad [Gl. 9]$$

Für y^0 gilt dabei:

$$y^0 = D / V \quad [Gl. 10]$$

D ist die Antibiotikumdosis, V das Verteilungsvolumen des Antibiotikums. Die graphische Darstellung der Bateman-Funktion ist aus Kurve III der Abb. 2 zu entnehmen.

Als weitere wichtige Parameter zur Beurteilung der Kinetik eines Antibiotikums seien hier noch die Maximalkonzentration y_{max} und die Fläche unter der Kurve (FUK) genannt.

2. 3 Verschiedene Einsatzmöglichkeiten des Modells

Bisherige Arbeiten mit dem Grasso-Modell beschäftigten sich mit der Funktionsweise des Modells [28], mit der Simulation diverser Antibiotikumaspiegel und deren Einwirkung auf die Keime [39, 71, 79, 80] und nur vereinzelt mit spezielleren klinischen Fragestellungen [64]. Welche weiteren, in der vorliegenden Arbeit behandelten Einsatzmöglichkeiten sich für das Modell ergeben, soll im folgenden vorgestellt werden.

2. 3. 1 Simulation von Plasmaspiegeln

Keine der bisherigen Arbeiten zur Simulation von Plasmaspiegeln hatte Untersuchungen mit dem als sehr anspruchsvoll geltenden Testorganismus *Neisseria gonorrhoeae* zum Inhalt [7, 54]. Da die sicher wirksame parenterale Einmalgabe eines Antibiotikums als Therapieform der Gonorrhoe anzustreben ist [54], eignen sich Untersuchungen mit dem Erreger *Neisseria gonorrhoeae* ganz besonders für eine Anwendung im Grasso-Modell, weil ein gesamtes Therapieschema relativ einfach einer genauen Prüfung unterzogen werden kann. Speziell in dieser Arbeit sollte die bakterizide Wirkung von Cefotiam-Plasmaspiegeln, wie sie an Probanden nach intramuskularer Einmalgabe ermittelt wurden, gegenüber *Neisseria gonorrhoeae* untersucht werden.

2. 3. 2 Simulation von Gewebsspiegeln

Ein weiterer wichtiger Schritt war bis zu Beginn der vorliegenden Untersuchungen ebenfalls nicht getan, nämlich die Simulation von Gewebsspiegeln; wichtig insofern, als bekanntlich das Gewebe in den meisten Fällen den Ort der Infektion darstellt, so auch bei der unkomplizierten Gonorrhoe [7, 54], und daher die Notwendigkeit besteht, nicht nur die Größenordnung dieser Spiegel zu kennen, sondern auch ihren spezifischen Beitrag zur Bakterizidie zu beleuchten [4]. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit eingehendere Untersuchungen zur Wirkung von Cefotiam-Gewebsspiegeln auf Gonokokken angestellt werden.

2. 3. 3 Untersuchungen zur optimalen Therapieform der Gonorrhoe

Hinsichtlich der Therapie bakterieller Infektionen und der Gonorrhoe im speziellen konnte bisher noch keine definitive Antwort auf die Frage gegeben werden, ob hohe, über einen kurzen Zeitraum anhaltende Antibiotikumspiegel oder ob niedrige, über einen langen Zeitraum aufrechterhaltene Spiegel als günstiger anzusehen sind. In der Literatur gibt es sehr gegensätzliche Aussagen zu dieser Fragestellung [4, 14, 19, 34, 36, 46, 60, 73, 75]. Um einer Klärung der Frage näher zu kommen, sollten in der vorliegenden Arbeit die Extremvarianten solcher Spiegelverläufe in einem für den Therapieerfolg kritischen Dosisbereich ($4 \times \text{MHK}$, [34]) mit dem Antibiotikum Cefotiam näher untersucht werden.

2. 3. 4 Dosisfindung in der Einmaltherapie der Gonorrhoe

Bevor ein neues Antibiotikum nach Vorabprüfung in die Therapie der Gonorrhoe eingeführt werden soll, muß zunächst die optimale Dosierung bestimmt werden. Dies geschieht üblicherweise durch sogenannte Dosisfindungsstudien, in denen an Patienten die Dosis-Wirkungs-Beziehung von extrem hohen Antibiotikumdosen bis hinab zu sehr niedrigen Dosen untersucht wird. Da solche Studien in der heutigen Zeit aufgrund ethischer und medizinischer Einwände schwerlich in ausreichendem Maße durchzuführen sind, soll mit dem vorliegenden Modell die Möglichkeit einer prä-klinischen Dosisfindung aufgezeigt werden. Als Grundlage hierfür diente eine von Eichmann und Mitarbeitern (1981) [22] durchgeführte klinische Dosisfindungsstudie mit dem Cephalosporin Ceftriaxon.

3 Material und Methodik

3. 1 Flüssigmedium

In der Literatur sind nur wenige flüssige Medien zur Kultur von *Neisseria gonorrhoeae* beschrieben worden. Die Suche nach einem für die angestrebten Untersuchungen geeigneten Medium war auf eine möglichst einfache experimentelle Handhabung ausgerichtet. Ein Medium beispielsweise, wie es von Brookes und Heden (1967) beschrieben wurde [8], schied daher aufgrund einer benötigten Belüftung mit CO₂-Gas, welche den Versuchsaufbau ungleich erschwert hätte, bald aus den angestellten Überlegungen aus.

Am geeignetsten erschienen schließlich die Flüssigmedien, welche von Hafiz und McEntegart (1976) und Morse et al. (1976) beschrieben wurden [31, 49]. Beide sind in der Grundzusammensetzung identisch, unterscheiden sich jedoch bezüglich des definierten Zusatzes zur optimalen Anreicherung der Gonokokken. Die Wahl fiel letztlich auf das Medium nach Morse, da der dort beschriebene definierte Zusatz unter der Bezeichnung Iso VitaleX™ Enrichment (BBL, Cockeysville, Md, USA) fertig im Handel erhältlich ist.

Das ausgewählte Medium hatte folgende Grundzusammensetzung:

-	Proteose Peptone no.3 (Difco, Detroit, Mich., USA)	15.0 g
-	K_2HPO_4 (Merck, Darmstadt, BRD)	4.0 g
-	KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, BRD)	1.0 g
-	Na Cl (Merck, Darmstadt, BRD)	5.0 g
-	Starke (Difco, Detroit, Mich., USA)	1.0 g
-	Aqua destillata	ad 1000.0 ml

Der pH-Wert des Mediums wurde auf einen Wert von 7.2 eingestellt. Daraufhin wurde bei 121° C für 30 min autoklaviert. Anschließend erfolgte mittels Sterilfiltration (Acrodisc, Gelman, Ann Arbor, Mich., USA) die Zugabe folgender Ingredienzien pro Liter:

-	Glucose (Merck, Darmstadt, BRD)	4.0 g
-	Na HCO ₃ (Merck, Darmstadt, BRD)	42.0 mg
-	Iso VitaleX™ Enrichment (BBL, Cockeysville, Md, USA)	10.0 ml

3. 2 Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika waren Cefotiam (CTM) und Ceftriaxon (CTRX), zwei neue Cephalosporine der 2. und 3. Generation. Beide waren im flüssigen Kulturmedium hervorragend löslich.

Cefotiam

Cefotiam (Spizef[®]) wurde freundlicherweise als Reinsubstanz von der Gruenenthal GmbH (Stolberg, BRD) zur Verfügung gestellt. Es gehört zur Gruppe der 7-Aminothiazolacetamido-Cephalosporine (Abb. 3), hat eine hohe β -Lactamase-Resistenz, ist im menschlichen Organismus zu 40% an Plasmaproteine gebunden und ist nur bei parenteraler Applikation verfügbar, wobei es zu 20% metabolisiert wird [58, 70].

Nach einer intramuskulären Injektion von 1 g Cefotiam wird im Mittel nach 69 min die durchschnittliche Plasmaspitzenkonzentration von 24.8 $\mu\text{g/ml}$ erreicht bei einer mittleren Eliminationshalbwertszeit von 89.4 min. Zudem besitzt es eine hervorragende Gewebspenetration, ein wichtiger Faktor, der auch am Ort der Infektion eine zufriedenstellende Konzentration von Cefotiam gewährleistet [42].

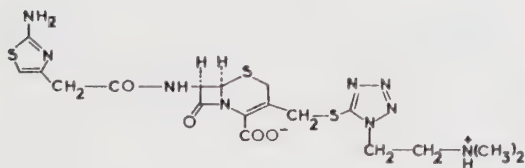


Abb. 3. Strukturformel von Cefotiam.

Ceftriaxon

Ceftriaxon (Rocephin®) als Reinsubstanz in Form eines Dinatriumsalzes wurde von Hoffmann-La Roche & Co. (Grenzach-Whylen, BRD) dankenswerterweise überlassen. Es besitzt ein breites Wirkungsspektrum sowohl gegenüber grampositiven als auch gramnegativen Bakterien, hat eine hohe β -Laktamase-Resistenz und unterscheidet sich zusätzlich noch von anderen Antibiotika dieser Klasse durch die sehr lange biologische Halbwertszeit von etwa 8 Stunden [15, 22] (Abb. 4).

Aufgrund dieses pharmakokinetischen Vorzugs, sowie der hohen In vitro-Aktivität gegenüber *Neisseria gonorrhoeae* [69] ist Ceftriaxon bestens für die Einmaltherapie der unkomplizierten Gonorrhoe geeignet [25, 32, 35], wobei eine Dosis von 250 mg klinisch hervorragend wirksam ist und auch vom Hersteller empfohlen wird [83].

Die Eiweißbindung von Ceftriaxon beträgt 96.1%, die Ausscheidung erfolgt ohne Metabolisierung in aktiver Form zu 60% über die Nieren und zu 40% über die Leber [58].

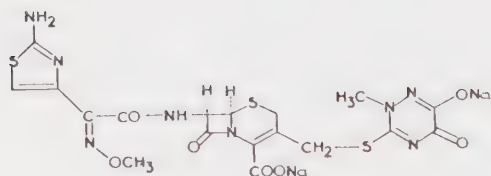


Abb. 4. Strukturformel von Ceftriaxon.

3. 3 Bakterienstämme

Bei den verwendeten Bakterienstämmen handelte es sich um rezente klinische Isolate von *Neisseria gonorrhoeae* aus der Sammlung des Bakteriologischen Labors der Münchener Dermatologischen Klinik und Poliklinik. Eine Zusammenstellung der untersuchten, nicht β -laktamase bildenden Stämme und ihre genaue Bezeichnung, sowie die MHK-Werte gegenüber den im jeweiligen Experimenttyp untersuchten Antibiotika ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1. Zur In vitro-Untersuchung herangezogene Gonokokkenstämme mit den für die einzelnen Experimenttypen maßgebenden MHK-Werten (Typ I: CTM Plasma/Gewebe; Typ II: CTM konstant/Peak; Typ III: CTRX).

Stamm	Experimenttyp	MHK-Wert ($\mu\text{g/ml}$)
3067/83	I	0.008
7291/83	I	0.250
2919/83	II	0.125
3067/83	III	0.008

Für die Bestimmung der MHK wurde der sogenannte Agarverdünnungstest herangezogen [16].

3. 4 Versuchsaufbau

Wie aus Abb. 5 ersichtlich, ist das Zentralstück der Versuchsanordnung ein mit Hilfe eines Thermostats (Thermomix 1420, Braun, Melsungen, BRD) auf 37°C erwärmtes Wasserbad, in dem sich die einzelnen Versuchsgefäße befinden (Gaswaschflaschen verschiedener Größe, Normschliff 29/32, Normschliffgerätebau, Wertheim, BRD), welche flüssiges Nährmedium enthalten. Die einzelnen Gefäße stehen untereinander durch ein luftdichtes Silikonschlauchsystem in Verbindung, wobei zwischen dem mit Reservoir bezeichneten Vorratsgefäß R und dem Antibiotikumgefäß B eine Pumpe P zwischengeschaltet ist, die einen konstanten Fluß gewährleistet. Das dritte Gefäß (Kulturgefäß A) schließlich enthält die Suspension einer Bakterienkultur in flüssigem Nährmedium.

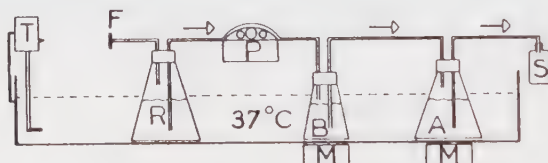


Abb. 5. Skizze der verwendeten Versuchsanordnung (Kulturgefäß A, Antibiotikumgefäß B, Vorratsgefäß R, Sammelgefäß S, Thermostat T, Magnetmotor M, Pumpe P, Filter F).

Im Gefäß B befindet sich zu Versuchsbeginn entsprechend einem genau definierten Mengen-Volumenverhältnis das Antibiotikum (Dosis) gelöst im Flüssigmedium (V_{inj} ; entspricht dem Ort der Injektion, z.B. nach intramuskulärer Applikation).

Dieser Antibiotikumlösung im Gefäß B wird im Laufe eines Versuches kontinuierlich sterile, antibiotikumfreie Nährbouillon aus dem Vorratsbehälter R (Reservoir) hinzugefügt und zwar mit Hilfe einer Vielfach-Schlauchpumpe (131900, Desaga, Heidelberg, BRD). Dadurch entsteht aufgrund des vorhandenen geschlossenen Systems im Gefäß B ein Überdruck, der die sich ständig verdünnende Antibiotikumlösung in das Gefäß A gelangen läßt, wobei dieses Volumen dem von R nach B gepumpten zu jeder Zeit identisch ist. Im Gefäß A kommt es damit zu einem Anstieg und Abfall der Antibiotikumkonzentration entsprechend einer biexponentiellen Zeitkurve (Bateman-Funktion, siehe Abschnitt 2. 2). Dieses Gefäß enthält bei Versuchsbeginn ca. 10^8 KBE/ml eines nach einstündiger Vorinkubation sich im logarithmischen Wachstum befindlichen Stammes von *Neisseria gonorrhoeae* als Keimsuspension in einer genau definierten Menge Nährbouillon (V_A). Ebenfalls in Abhängigkeit von den im geschlossenen System herrschenden Druckverhältnissen wird die mit Antibiotikum versetzte Keimsuspension kontinuierlich entsprechend der Pumpengeschwindigkeit aus dem Gefäß A nach außen in ein Sammelgefäß S gefordert, was die Probenentnahme sowohl zur Keimzählung als auch zur Antibiotikumkonzentrationsbestimmung zu bestimmten, vorher festgelegten Zeitpunkten ermöglicht.

Die homogene Verteilung der gelösten Partikel in den Gefäßen A und B wurde durch zwei Magnetmotoren (IKA MAG-RO Motor, IKA-Werk, Stauffen, BRD) gewährleistet.

3. 5 Berechnung der Versuchsparameter

Um nun einen Hauptversuch mit der in Abschnitt 3. 4 beschriebenen Versuchsanordnung starten zu können, ist es zuvor nötig, einige wichtige Versuchsparameter rechnerisch festzulegen. Dazu zählen: Absorptionskonstante (k_a), Eliminationskonstante (k_e), Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$), Flußrate der Pumpe (F), Volumina der Gefäße A und B (V_A , V_B), sowie die benötigte Antibiotikumdosis (D).

Die Grundlage für die Berechnungen stellen folgende Formeln dar, deren mathematische Herleitung im Abschnitt 2. 2 dargestellt wurde:

$$(I) \quad C(t) = (D/V_A) \cdot k_a / (k_a - k_e) \cdot (e^{-k_e t} - e^{-k_a t})$$

$$(II) \quad k_a = F/V_B$$

$$(III) \quad k_e = F/V_A$$

$$(IV) \quad t_{1/2} = \ln 2 / k_e$$

Wie die Parameter für die einzelnen Versuchsansätze mit Hilfe der genannten Formeln ermittelt wurden, soll nachfolgend im Detail erläutert werden.

3. 5. 1 Cefotiam-Plasmaspiegel

Die Daten für die In vitro-Simulation von Plasmaspiegeln nach einmaliger intramuskulärer Applikation von 1 g Cefotiam basierten auf einer vorangegangenen klinischen Studie an gesunden Probanden [42].

Diese Studie ergab zu bestimmten Zeitpunkten [t_x(min)] folgende Cefotiam-Plasmakonzentrationen (µg/ml):

t₁₅: 13.13; t₃₀: 19.20; t₆₉: 24.80; t₁₂₀: 20.16;

t₁₈₀: 12.06; t₂₄₀: 9.06; t₃₆₀: 3.40;

Die daraus ermittelte Plasmahalbwertszeit t_½ beträgt 89.4±15.6 min. Damit läßt sich als erstes die Eliminationskonstante nach Umformung von Formel (IV) bestimmen:

$$k_e = \ln 2 / 89.4 \text{ min} = 0.0077 \text{ min}^{-1}$$

Im nächsten Schritt erfolgt die Bestimmung der Absorptionskonstante gemäß folgender Formel [26]:

$$k_a = [\ln(y^0 / y^0 - y)] / t \quad \text{mit } y^0 = y / e^{-k_e t}$$

Dabei ist y⁰ der gedachte Schnittpunkt der Eliminationsgeraden einer Bateman-Funktion mit der y-Achse. Mit einem ermittelten y⁰-Wert von 52.725 µg/ml ergibt sich:

$$k_a = 0.0170 \text{ min}^{-1}$$

Setzt man nun das Volumen im Gefäß A mit $V_A = 105 \text{ ml}$ fest, so ergibt sich für die Flußrate unter Berücksichtigung von Formel (III):

$$F = k_e \cdot V_A = 0.81 \text{ ml/min}$$

Für das Volumen im Gefäß B gilt dann gemäß Formel (II):

$$V_B = F/k_a = 47.6 \text{ ml}$$

Die Antibiotikumdosis D errechnet sich durch Umformung der Formel (I) nach D und hat hier folgenden Wert:

$$D = 5.2 \text{ mg}$$

In Tabelle 2 sind all diese Parameter noch einmal zusammengefaßt.

Tabelle 2. Wichtige pharmakokinetische Daten zur In vitro-Simulation von Plasma- und Kantharidinblasenflüssigkeitsspiegeln (KBF) nach einmaliger i.m.-Injektion von 1 g Cefotiam.

Parameter	Plasma	KBF
Absorptionskonstante k_a (min^{-1})	0.0170	0.010
Eliminationskonstante k_e (min^{-1})	0.0077	0.003
Halbwertszeit $t_{1/2}$ (min)	89.40	232.01
Flußrate F (ml/min)	0.81	0.50
Volumen V_A (ml)	105.0	166.70
Volumen V_B (ml)	47.60	50.00
Dosis D (mg)	5.20	3.0

3. 5. 2 Cefotiam-Gewebsspiegel

Die bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnte klinische Studie an gesunden Probanden nach einmaliger i.m.-Injektion von 1 g Cefotiam [42] war auch Ausgangspunkt für die Simulation von Gewebsspiegeln im In vitro-Modell.

Hierzu wurden auf der Bauchhaut der Probanden sogenannte Kantharidinblasen erzeugt, deren flüssiger Inhalt zu bestimmten Zeitpunkten auf den Gehalt an Antibiotikum untersucht wurde. Die auf diese Weise ermittelten Daten können als Äquivalenzspiegel für das Gewebe, den eigentlichen Ort der Infektion in den meisten Fällen, herangezogen werden [62] und sind somit geeignet für eine Simulation derselben im Grasso-Modell mit Blick auf die Einmaltherapie der Gonorrhoe.

Die Berechnung der Parameter für diesen Versuchsansatz erfolgte auf die gleiche Weise, wie es im vorherigen Abschnitt für die Cefotiam-Plasmaspiegel beschrieben wurde. Sie sind im einzelnen in Tabelle 2 unter der Spalte KBF (Kantharidinblasenflüssigkeit) aufgelistet.

3. 5. 3 Niedrige kontinuierliche Spiegel vs. kurzanhaltende Spitzenspiegel von Cefotiam

Diese Untersuchungen nahmen ihren Ausgangspunkt von einem mehr theoretischen Ansatz. Ausgehend von der Fläche unter der Kurve (FUK) als Maß der Vergleichbarkeit sollten verschiedene niedrige kontinuierliche Cefotiam-Konzentrationsverläufe mit den entsprechenden relativ kurzanhaltenden Spitzenspiegeln derselben Substanz in Relation gesetzt werden.

Für die Berechnung der benötigten Versuchsparameter wurde folgendermaßen vorgegangen: gemäß der klinischen Studie von Jaffe et al. (1979) [34], in welcher ein überschreiten der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Penizillin um das Vierfache über einen Zeitraum von 7 bis 10 Stunden als Determinante für eine erfolgreiche Therapie der Gonorrhoe herausgestellt wurde, sollte dieser "kritische Bereich" genauer untersucht werden. Es wurden daher folgende Konzentrationszeitverläufe im Modell eingestellt: das Vierfache (4xMHK), das Einfache (1xMHK) und die Hälfte (0.5xMHK) der MHK von Cefotiam gegenüber dem Teststamm von *Neisseria gonorrhoeae* in einem konstanten Konzentrationsverlauf wurde den entsprechenden Spitzenspiegeln (Peak) mit identischer FUK vergleichend gegenübergestellt.

Die MHK des untersuchten Stammes von *Neisseria gonorrhoeae* (2919/83) betrug 0.125 µg/ml. Für die Untersuchung von 4xMHK mußte somit ein konstanter Cefotiam-Spiegel von 0.5 µg/ml über 8 Stunden gewährleistet sein. Da es sich bei diesem Kurvenverlauf geometrisch gesehen um ein Rechteck handelt, das die Konzentrationszeitkurve mit Abszisse und Ordinate bildet, läßt sich die FUK durch Multiplikation der beiden Seitenlängen berechnen. Es folgt daher:

$$FUK = 240 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min} \quad \text{für } 4xMHK$$

Legt man die Flußrate für die Peakverläufe mit $F = 0.9 \text{ ml/min}$ und das Volumen in Gefäß A mit $V_A = 60 \text{ ml}$ fest, so ergibt sich nach Formel (III) für die Eliminationskonstante:

$$k_e = 0.015 \text{ min}^{-1}$$

Daher folgt nach der Formel [26]

$$FUK = y^0 / k_e \quad \text{für } y^0 : \quad y^0 = 3.6 \mu\text{g/ml} .$$

Setzt man das Volumen im Gefäß B mit $V_B = 10 \text{ ml}$ fest, so ergibt sich eine Absorptionskonstante $k_a = 0.09 \text{ min}^{-1}$ nach Formel (II).

Die Maximalkonzentration eines solchen Kurvenverlaufs errechnet sich dann nach der Formel:

$$y_{\max} = y^0 \cdot (k_a / k_e)^{k_e / (k_a - k_e)} = 2.52 \mu\text{g/ml}$$

Der Zeitpunkt des Auftretens dieses Maximums liegt nach der Formel

$$t_{\max} = (\ln k_a - \ln k_e) / (k_a - k_e) \quad \text{bei } 24 \text{ min.}$$

Somit läßt sich nach Umformung von Formel (I) die benötigte Cefotiam-Dosis für den entsprechenden Peak-Konzentrationsverlauf, dessen FUK $240 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}$ beträgt, mit $D = 0.217 \text{ mg}$ berechnen.

Auf gleiche Weise wie oben für 4xMHK gezeigt, errechnen sich auch die Parameter für 1xMHK und 0.5xMHK. Eine Zusammenstellung aller benötigten Parameter ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3. Wichtige Parameter zur In vitro Untersuchung des bakteriziden Effektes verschiedener CTM-Konzentrationsprofile mit jeweils identischer FUK gegenüber *Neisseria gonorrhoeae*.

Parameter	Peak	konstant
Absorptionskonstante k_a (min^{-1})	0.090	-
Eliminationskonstante k_e (min^{-1})	0.015	-
Halbwertszeit $t_{1/2}$ (min)	46.210	-
Flußrate F (ml/min)	0.900	0.650
Volumen V_d (ml)	60.000	100.00
Volumen V_0 (ml)	10.00	-
Dosis D (mg)		
(4xMHK)	0.217	-
(1xMHK)	0.054	-
($\frac{1}{2}$ xMHK)	0.027	-
FUK ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}$)		
(4xMHK)	240.00	240.00
(1xMHK)	60.00	60.00
($\frac{1}{2}$ xMHK)	30.00	30.00

3. 5. 4 Ceftriaxon-Konzentrationsverläufe

Als Basis für die Berechnung der Parameter zur In vitro-Simulation verschiedener Ceftriaxon-Konzentrationsverläufe nach einmaliger intramuskulärer Injektion diente die pharmakokinetische Studie von Delsignore et al. (1983) [15], in der gesunden Probanden einmalig 1.5 g Ceftriaxon intramuskular

verabreicht wurde. Entsprechend der gegebenen Linearität ließen sich auch die Parameter für die zu simulierenden Konzentrationszeitverläufe nach einmaliger intramuskulärer Injektion von 1000 mg, 250 mg, 125 mg, 50 mg und 25 mg Ceftriaxon aus der angesprochenen Studie ableiten.

Die Vorgehensweise war folgende:

schreibt man die Formel (I) aus Abschnitt 3. 5 mit

$$A = D/V_A \cdot k_a / (k_a - k_e)$$

um, so ergibt sich für die Bateman-Funktion:

$$C(t) = A (e^{-k_e t} - e^{-k_a t})$$

Mit Hilfe des RIP-Programms [33] zur Verarbeitung gegebener Probandendaten ergab sich für die einmalige i.m.-Injektion von 1.5 g Ceftriaxon folgende explizite Darstellung der hierfür spezifischen Bateman-Funktion:

$$C(t) = 8.03 (e^{-0.001446t} - e^{-0.029433t})$$

Daraus lassen sich bereits die beiden Konstanten ablesen:

$$k_a = 0.029433 \text{ min}^{-1}$$

$$k_e = 0.001446 \text{ min}^{-1}$$

Mit $V_A = 300 \text{ ml}$ ergibt sich für die Flußrate nach Formel (III):

$$F = 0.4338 \text{ ml/min}$$

Für das Antibiotikumgefäß gilt nach Formel (II):

$$V_B = 14.74 \text{ ml}$$

Mit $y^0 = A \cdot (k_a - k_e) / k_a$ ergibt sich für die Dosisberechnung:

$$D = y^0 \cdot V_A$$

Somit gilt für die Simulation von 1500 mg i.m.:

	$D = 7.64 \cdot 300 \mu g \rightarrow D = 2292 \mu g$
Für 1000 mg:	$D = 2292 \cdot 2/3 \mu g \rightarrow D = 1528 \mu g \rightarrow D = 1.53 \text{ mg}$
Für 250 mg:	$D = 2292 \cdot 1/6 \mu g \rightarrow D = 382 \mu g \rightarrow D = 0.38 \text{ mg}$
Für 125 mg:	$D = 2292 \cdot 1/12 \mu g \rightarrow D = 191 \mu g \rightarrow D = 0.19 \text{ mg}$
Für 50 mg:	$D = 2292 \cdot 1/30 \mu g \rightarrow D = 76 \mu g \rightarrow D = 0.08 \text{ mg}$
Für 25 mg:	$D = 2292 \cdot 1/60 \mu g \rightarrow D = 38 \mu g \rightarrow D = 0.04 \text{ mg}$

Abschließend ist noch anzumerken, daß alle Parameter auf der nicht an Protein gebundenen Fraktion von Ceftriaxon basieren, welche 3.9% beträgt [15]. Eine Zusammenstellung aller Parameter ist der Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4. Wichtige Parameter für die In vitro-Simulation von Konzentrationsverläufen nach einmaliger i.m.-Injektion verschiedener Ceftriaxon-Dosen.

Parameter

Absorptionskonstante k_a [min^{-1}]	0.029433
Eliminationskonstante k_e [min^{-1}]	0.001446
Halbwertszeit $t_{1/2}$ [min]	479.4
Flußrate F [ml/min]	0.4338
Volumen V_d [ml]	300.00
Volumen V_e [ml]	14.74
Dosis D [mg]	(1000 mg) 1.53
	(250 mg) 0.38
	(125 mg) 0.19
	(50 mg) 0.08
	(25 mg) 0.04

3. 6 Methodischer Versuchsablauf

Vor Versuchsbeginn wurden alle im Hauptversuch verwendeten Gefäße mit den entsprechenden Mengen der Bouillon nach Morse et al. [49] gefüllt und zusammen mit den Silikonverbindungs-schläuchen, den Schlauchpumpeneinsätzen und diversen Reagenzgläsern, die zur Inkubation, für Verdünnungsreihen und zur Probenentnahme benötigt wurden, bei 121°C für 30 min autoklaviert.

Ebenfalls vor Versuchsbeginn mußte das mit ausreichender Menge Aqua destillata gefüllte Wasserbad mit Hilfe des Thermostats auf 37°C erwärmt werden.

Währenddessen wurden zwei Spots einer 16 Stunden alten Hamoglobinagar-Kultur von *Neisseria gonorrhoeae* mit Hilfe einer Platinöse in ein mit 2.5 ml steriler Nahrbouillon gefülltes Reagenzglas überimpft und unter Verwendung eines Rüttlers (Best.-Nr. 34524-200, Cenco instrumenten, Breda, Netherlands) homogenisiert. Anschließend wurde diese Suspension unter sterilen Bedingungen in das nun erwärmte Kulturgefaß A eingebracht und dann für 1 Stunde unter der gleichmäßigen Bewegung eines Magnetrührers vorinkubiert. Während dieser Stunde vermehrten sich die Gonokokken und gelangten in das Stadium des logarithmischen Wachstums. Bei Versuchsbeginn fanden sich dann 10^7 - 10^8 Keime pro ml Nährlösung.

Während der einen Stunde erfolgte auch die Einwaage der Antibiotikumdosis mit Hilfe einer Präzisionswaage (Sartorius, Typ 1712, Göttingen, BRD). Anschließend wurde diese Menge Antibiotikum in einer proportionalen Menge Nahrbouillon gelöst und mittels Sterilfiltration (Mikrofilter SM 16534K, Sartorius, Göttingen, BRD) in das bereits autoklavierte Antibiotikumgefaß

eingegeben. Letzteres war ebenfalls, um eine gleichmäßige Konzentrationsverteilung zu erreichen, mit einem Magnetrührer versehen.

Das Vorratsgefäß enthielt vor Versuchsbeginn ein ausreichend großes Reservoir an steriler Nährbouillon.

Nachdem nun alle Gefäße entsprechend vorbereitet, die sterilen Schlauchsysteme zusammengefügt und ein Luftfilter (Mikrofilter SM 16534K, Sartorius, Göttingen, BRD) am Vorratsgefäß bzw. ein Ausführungsteil am Kulturgefäß angebracht waren, konnte die Schlauchpumpe und damit der eigentliche Versuch gestartet werden.

Von diesem Zeitpunkt t_0 an förderte diese Pumpe eine konstante Menge an Nährlösung über die Versuchsdauer von 8-9 Stunden aus dem Vorratsgefäß. Entsprechend den in Abschnitt 3.4 beschriebenen Druckverhältnissen im System trat durch das Ausführungsteil des Kulturgefäßes kontinuierlich Nährlösung aus, welche zu festgelegten Zeitpunkten auf ihre Antibiotikumkonzentration bzw. ihren Keimgehalt hin untersucht wurde.

Bei der Keimzählung geschah dies vom Zeitpunkt Null an stündlich durch Probenahme mit einem sterilen Reagenzglas, welches dann dem weiteren Procedere der Keimzahlbestimmung, wie es unter Abschnitt 3. 7 beschrieben ist, unterzogen wurde.

Die genauen Zeitpunkte der Probenentnahme für die Antibiotikumkonzentrationsbestimmung, sowie eine genaue Darstellung des angewandten Verfahrens sind im Kapitel 3. 8 dargestellt.

Die einzelnen Teilversuche wurden zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit zumindest doppelt, zum größten Teil jedoch sogar dreifach durchgeführt. Zu jedem Versuchsansatz lief auch ein Leerversuch ohne Antibiotikum, um die Unabhängigkeit der Versuchsergebnisse von den dynamischen Bedingungen zu beweisen.

3. 7 Keimzahlbestimmung

Die Keimzählung wurde mit Hilfe der Membranfiltrationsmethode durchgeführt (16). Das methodische Vorgehen gestaltete sich folgendermaßen: die stündlich aus dem Kulturgefäß gewonnenen Proben mußten zunächst, um eine günstige, möglichst im zweistelligen Zahlenbereich liegende Keimdichte auf dem Filter zu erreichen, in Serie verdünnt werden. Die dazu nötigen Verdünnungsreihen (Reagenzgläser mit 1.8 ml steriler Morse-Bouillon) waren in einem Wasserbad ebenfalls auf 37°C erwärmt und wurden von einer Probe stets in doppelter Ausführung hergestellt. Für eine optimale Suspension jeder Verdünnungsstufe sorgte der Einsatz eines Rüttlers.

Der Reagenzglasinhalt der beiden jeweils letzten Schritte einer Verdünnungsreihe wurde dann in ein zuvor im Autoklaven sterilisiertes Edelstahlfiltrationsgerät (SM 16201, Sartorius, Göttingen, BRD) eingegeben und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe in eine vakuumfeste 2-Liter-Saugflasche (SM 16606, Sartorius, Göttingen, BRD) abgesogen. Zum Spülen der Ränder wurden zusätzlich noch 20 ml steriler, vorgewärmter Nährbouillon dem Gerät zugeschüttet. Die zum Auffangen der Gonokokken verwendeten sterilen Filterscheiben waren aus Zellulosenitrat gefertigt, hatten einen Durchmesser von 50 mm und eine Porengröße von 0.2 µm (SM 11407, Sartorius, Göttingen, BRD). Nach jedem Filtrationsvorgang wurde die jeweilige Filterscheibe sofort mit einer sterilen Pinzette dem Gerät entnommen, zentral auf eine Hamoglobinagarplatte plaziert und anschließend für 48 Stunden bei 35.5°C und 5% CO₂-Spannung bebrütet.

Danach erfolgte die Auszählung der sich entwickelnden Kolonien, ein Vorgang, der durch ein auf die Filterscheiben aufgedrucktes Zahlnetz erleichtert wurde. Da jeder Meßzeitpunkt

doppelt ausgewertet wurde, stellen die unter Abschnitt 4 dargestellten graphischen Resultate der Keimzählung das arithmetische Mittel der Einzeldaten dar.

3. 8 Antibiotikumkonzentrationsbestimmung

Die Antibiotikumkonzentrationsbestimmung wurde sowohl für Cefotiam als auch für Ceftriaxon nach dem Prinzip des Agardiffusionstests durchgeführt [16, 40]. Da diese Methode für beide Antibiotika im wesentlichen gleich verläuft, soll sie im folgenden exemplarisch für das Antibiotikum Cefotiam beschrieben werden.

24 Stunden vor Durchführung des Agardiffusionstests wurden Kulturen des Teststammes *Proteus mirabilis* ATCC 21100 (American Type Culture Collection, Rockville, Md, USA) auf Schrägagar (Standard I, Merck, Darmstadt, BRD) angelegt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Herstellung der Testplatten (Petrischalen der Größe 12x12 cm) unter Verwendung des Nährmediums DST-Agar (Oxoid GmbH, Wesel, BRD) bei einem eingestellten pH-Wert von 8.0. Zu jeweils 100 ml dieses nach dem Autoklavieren auf 46°C abgekühlten Agars wurden 0.5 ml der folgenderweise hergestellten Keimsuspension von *Proteus mirabilis* ATCC 21100 gegeben: von einer 24-Stunden-Schrägagarkultur wurde der Testkeim mit 3.5 ml Aqua dest. abgeschwemmt und die so entstandene Suspension im Verhältnis 1:20 verdünnt, womit sie gebrauchsfertig war und dem Agar zugegeben werden konnte. Jeweils 30 ml dieses Agars wurden mit Hilfe des Petrimaten (K & B Grubbs Instrument GmbH, Düsseldorf, BRD) in die sterilen Petrischalen eingefüllt. Anschließend lagerten die so hergestellten Testplatten bei +4°C für 3 Stunden im Kühlgerät. Währenddessen erfolgte zunächst die

Herstellung der Standardlösungen von Cefotiam in Morse-Bouillon (Bereich in $\mu\text{g/ml}$: 8; 4; 2; 1; 0.5). Die zu untersuchenden Cefotiam-Proben, welche im jeweiligen Versuch nach Entnahme zu den festgelegten Zeitpunkten (tx [min]: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135; von jetzt an stündlich bis zum Versuchsende) durch Sterilfiltration (SM 16534K, Sartorius, Gottingen, BRD) von den vorhandenen Gonokokken befreit und sofort im Anschluß bei -80°C in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (Typ 3810, 1.5 ml, Eppendorf Gerätebau, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg, BRD) eingefroren worden waren, wurden nach dem Auftauen, falls aufgrund der errechneten Konzentration für nötig erachtet, durch eine Verdünnung mit steriler Nährbouillon hinab in den erwähnten Standardbereich für den Agar-diffusionstest vorbereitet.

Nach der dreistündigen Kühlung wurden mit Hilfe einer sterilen Hautbiopsiestanze pro Testplatte 9 Löcher mit einem Durchmesser von 4 mm in den Agar gestanzt. Die Agarscheibchen wurden mit einer Einmalkanule ausgehoben. In die so entstandenen Löcher wurden je 20 μl der 5 Standardlösungen und in die restlichen 4 Löcher je 20 μl des Untersuchungsmaterials einpipettiert. Danach wurden die Agarplatten auf einer waagrecht eingestellten Unterlage bei 37°C für 20-22 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die sich anschließende Auswertung der um die einzelnen Löcher gebildeten Hemmhöfe wurde mit einer Schublehre (Genauigkeit 0.1 mm) vollzogen. Dabei wurde jede einzelne Probe des Untersuchungsmaterials doppelt bestimmt. Die so gefundenen Hemmhofdurchmesser der Standardlösungen wurden auf halblogarithmisches Millimeterpapier gegen die Cefotiamkonzentration aufgetragen. Auf diese Weise erhält man eine Standardgerade, mit deren Hilfe die unbekannten Konzentrationen bestimmt werden.

Die Bestimmung der Ceftriaxonkonzentrationen erfolgte methodisch auf die gleiche Weise [16, 40].

4 Ergebnisse

4. 1 Vergleich zwischen Trübungsmessung und Lebendkeimzahlbestimmung

Bei der Suche nach einer geeigneten Methode für die Keimzahlbestimmung von *Neisseria gonorrhoeae* wurden im Vorfeld zwei Verfahren getestet. Zum einen die Membranfiltrationsmethode und zum anderen die Nephelometrie [16].

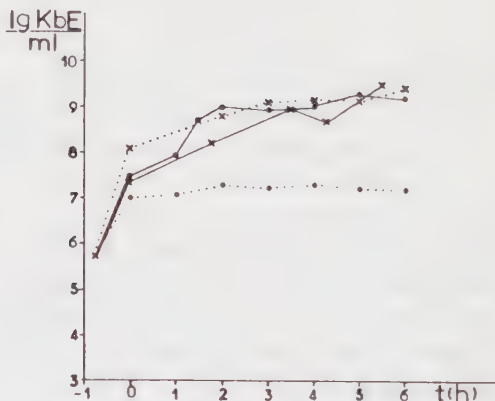
Dabei zeigte sich, daß unter statischen Wachstumsbedingungen einer Flüssigkultur von *Neisseria gonorrhoeae* in Morse-Bouillon [49] beide Methoden gleichermaßen zur Bestimmung der Keimzahl geeignet sind (Abb. 6). Wird die Gonokokkenkultur jedoch durch Hinzufügen steriler Nährlösung gemäß einer festgelegten Flußrate kontinuierlich verdünnt, so ergibt sich unter den auf diese Weise entstandenen dynamischen Versuchsbedingungen eine Diskrepanz zwischen beiden Verfahren. Diese äußert sich dadurch, daß unter dynamischen Bedingungen die Membranfiltrationsmethode ein real vorhandenes Wachstum vermehrungsfähiger Gonokokken anzeigt, daß aber die Trübungsmessung unter diesen Prämissen nicht das entsprechende Ergebnis liefert, sondern ein Sistieren der Keimzahl auf einer bestimmten Stufe vortäuscht (Abb. 6).

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, daß für Untersuchungen mit *Neisseria gonorrhoeae* im Grasso-Modell von den beiden angesprochenen nur die Membranfiltrationsmethode geeignet ist.

Ähnliche Ergebnisse erzielten Bergan et al. (1980) [6] bei Untersuchungen mit verschiedenen anderen gramnegativen und grampositiven Erregern in einem In vitro-Modell, nämlich daß

bei Untersuchungen mit gramnegativen Erregern die Lebendkeimzahlbestimmung vorzuziehen sei.

Abb. 6. Vergleich zwischen Membranfiltrationsmethode (MF) und Trübungsmessung (TM) in der Erfassung des Wachstumsverhaltens des Gonokokkenstammes 7291/83 unter statischen (MF X—X; TM X·····X) bzw. dynamischen (MF ●—●; TM ●·····●) Bedingungen.

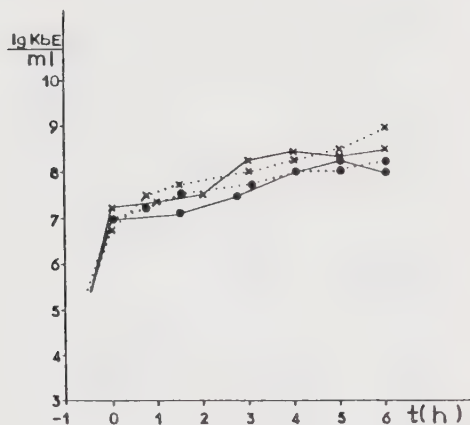


4. 2 Leerversuche

Vor den eigentlichen Hauptversuchen mit dem Grasso-Modell mußte zunächst gezeigt werden, daß trotz der Tatsache, daß mit der Nährlösung und dem Antibiotikum ständig auch Keime über den Ausführungsschlauch des Kulturgefäßes ausgeschwemmt werden, die Keimzahl ähnlich wie unter statischen Bedingungen zunimmt. Dies geschah in sogenannten Leerversuchen ohne Antibiotikum für jeden einzelnen untersuchten Keim mit Flußraten, die jeweils über denen der Hauptversuche lagen. Dabei konnte gezeigt werden, daß das Wachstum jedes einzelnen untersuchten Stammes

von *Neisseria gonorrhoeae* von der vorhandenen Verdünnung nicht signifikant beeinflusst wird (Abb. 6, 7).

Abb. 7. Entwicklung der Keimdicke der Gonokokkenstämme 2919/83 (X) und 3067/83 (●) ohne Zusatz von Antibiotikum unter statischen (.....) und dynamischen (——) Bedingungen.



4. 3 Einflüsse unterschiedlicher Cefotiamkonzentrationen auf *Neisseria gonorrhoeae*

Plasmaspiegel-Simulation

Bei der Simulation von Cefotiam-Plasmaspiegeln zeigte sich in allen Versuchen innerhalb der ersten Stunden eine starke Abnahme der Bakteriendichte. Im weiteren Versuchsverlauf war die Reduktion der Keime weniger dramatisch. Während dieser initiale Abfall der Keimdichte mehr oder weniger ähnlich ausgeprägt war bei den beiden untersuchten Stämmen, die sich hinsichtlich ihrer MHK unterschieden (Tabelle 5), so war doch die weitere Reduktion der Bakterien bei dem (laut MHK-Bestimmung) weniger empfindlichen Stamm auch weniger stark ausgeprägt (Abb. 8). Diese Tendenz wird noch deutlicher, wenn man die Mittelwert-Kurven für beide Stämme gegenüberstellt (Abb. 9). Zieht man die Parameter zur Beurteilung des bakteriziden Effektes heran [68], so läßt sich folgendes sagen: während eine 99%ige Reduktion der Keimdichte ($t_{99\%}$) mit beiden Stämmen in gleicher Weise nach etwa 1.20 Stunden erreicht wird (Tabelle 5), so bestehen bei der maximalen relativen Keimreduktion (k_n) - ein Maß für die maximale Abnahme der Keimzahl in Abhängigkeit von der Ausgangskeimzahl - deutliche Unterschiede, wobei die k_n -Werte sich um ein 250-faches unterscheiden. Auch der Zeitpunkt t , zu dem diese niedrigste Keimdichte erreicht wird, differiert bei beiden Stämmen in dem Sinne, daß er bei dem weniger empfindlichen Stamm früher erreicht wird (Tabelle 5).

Allgemein läßt sich für alle Experimente sagen, welche die Simulation von Cefotiam-Plasmaspiegeln zum Inhalt hatten, daß die Bakteriendichte stets sehr stark reduziert wurde, daß jedoch in keinem Experiment die Gonokokken vollständig eliminiert wurden.

Tabelle 5. Parameter zur Beurteilung des bakteriziden Effektes von Plasma- und Gewebsspiegeln des Antibiotikums Cefotiam gegenüber Stämmen von *Neisseria gonorrhoeae* mit unterschiedlichen MHK-Werten.

Stamm	MHK [µg/ml]	Plasmaspiegel			Gewebsspiegel		
		t _{99%} [h]	kn [%]	t [h]	t _{99%} [h]	kn [%]	t [h]
3067/83	0.008	1.17	0.00004	8.0	2.29	0.0009	9.00
7291/83	0.25	1.20	0.01	5.33	3.19	0.005	8.33

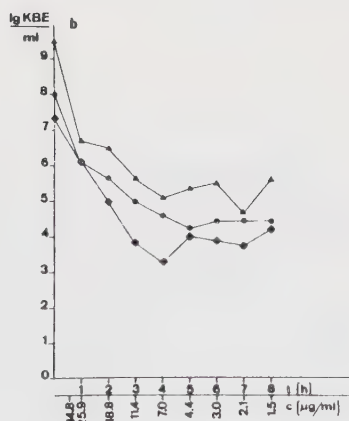
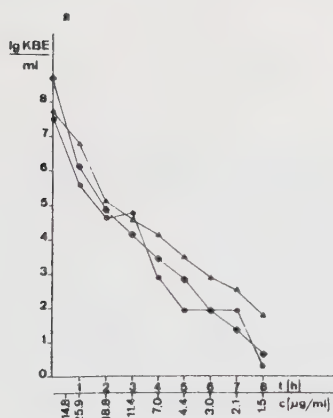
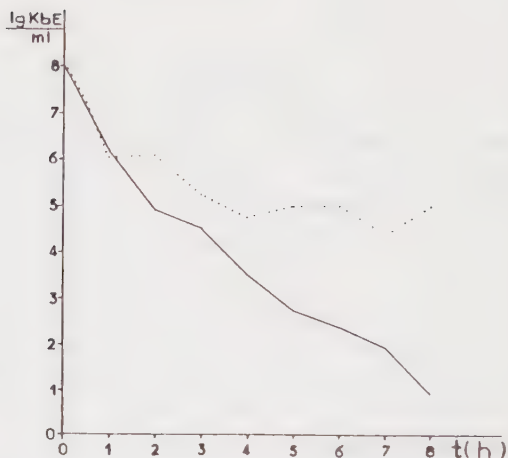


Abb. 8. Entwicklung der Keimdichte von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß simulierter CTM-Plasmaspiegel. a. Stamm 3067/83. b. Stamm 7291/83.

Abb. 9. Entwicklung der Keimdichte von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß simulierter CTM-Plasmaspiegel (Mittelwert-Kurven). (—) Stamm 3067/83, (.....) Stamm 7291/83.



Gewebsspiegel-Simulation

Die Simulation von Cefotiam-KBF-Spiegeln ergab eine im Vergleich zu den Plasmaspiegeln weniger stark ausgeprägte initiale Abnahme der Bakteriedichte (Abb. 10), was sich auch in einer längeren t_{max} ausdrückt (Tabelle 5). In der terminalen Versuchsphase jedoch zeigte sich, daß die maximale relative Reduktion (k_n) der Keimzahl letztendlich derjenigen ähnlich ist, die bei der Simulation von Plasmaspiegeln gefunden wurde (Tabelle 5). Interessanterweise waren die Ergebnisse bei der Simulation von KBF-Spiegeln weitgehend unabhängig von den unterschiedlichen MHK-Werten der beiden Stämme (Tabelle 5, Abb. 11).

Wie schon bei der Simulation von Plasmaspiegeln laßt sich auch bei den Gewebsspiegeln die Aussage treffen, daß die Bakteriendichte in allen Versuchen in einem hohen Maße reduziert wurde. Eine vollständige Eradizierung der Keime gelang jedoch in keinem Versuch.

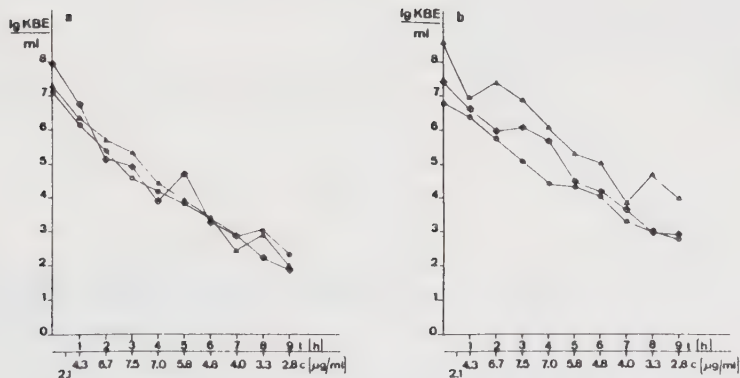
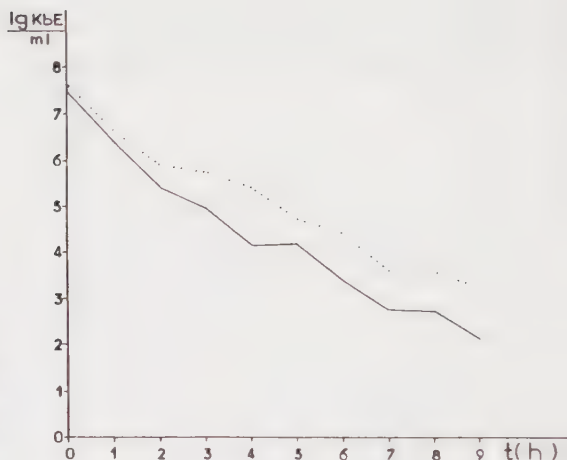


Abb. 10. Entwicklung der Keimdicke von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß simulierter CTM-KBF-Spiegel. a. Stamm 3067/83. b. Stamm 7291/83.

Abb. 11. Entwicklung der Keimdichte von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß simulierter CTM-KBF-Spiegel (Mittelwert-Kurven). (—) Stamm 3067/83. (.....) Stamm 7281/83.



Niedrige langanhaltende Spiegel vs. kurzanhaltende Spitzenspiegel

Unter dem Einfluß von Cefotiam-Konzentrationen, die über eine Dauer von 8 Stunden die MHK des untersuchten Gonokokkenstammes kontinuierlich um das Vierfache übersteigen, kommt es zu einem sehr starken Abfall der Keimdichte (Abb. 12). Dieser bakterizide Effekt läßt sich auch durch die Parameter k_n , t und $t_{99\%}$ zum Ausdruck bringen (Tabelle 6). Ein im Prinzip ähnliches Ergebnis liefert der kontinuierliche Einfluß der einfachen MHK über die Dauer von 8 Stunden (Abb. 12). Unter der Einwirkung eines Konzentrationsverlaufs, der über 8 Stunden konstant die halbe MHK repräsentiert, kommt es nur initial zu

einem leichten Abfall der Keimzahl, im weiteren Verlauf jedoch beginnen sich die Gonokokken wieder zu vermehren (Abb. 12). Dieser stark abgeschwächte bakterizide Effekt wird auch dadurch deutlich, daß eine 99%ige Reduktion der Keimzahl unter diesen Bedingungen überhaupt nicht erreicht wird (Tabelle 6).

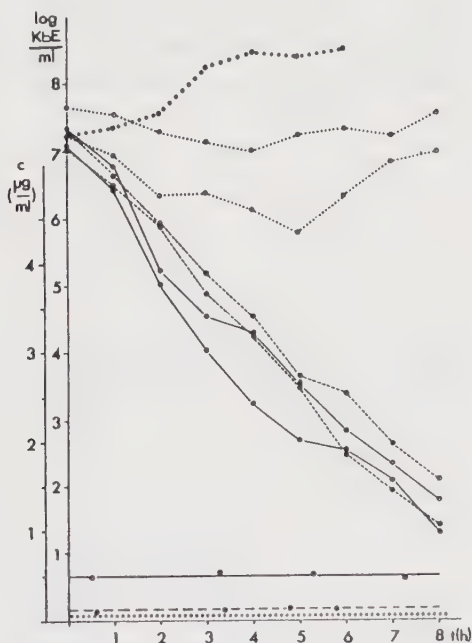


Abb. 12. Entwicklung der Keimdicke von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß verschiedener konstanter CTM-Konzentrationen. (—) 4xMHK, (----) 1xMHK, (.....) 1/2xMHK, (● ● ● ●) Kontrolle.

Läßt man nun im Gegensatz zu den konstanten Spiegelverläufen Cefotiamkonzentrationen mit zwar identischer FUK, aber steilem initialen Anstieg, Maximum und entsprechend steilem Abfall auf den untersuchten Stamm von *Neisseria gonorrhoeae* einwirken, so ergeben sich im Bereich der

vierfachen MHK keine wesentlichen Unterschiede (Abb. 13, Tabelle 6). Dies gilt nicht für die beiden niedrigeren Konzentrationsbereiche: während im Bereich der einfachen MHK der konstante Spiegelverlauf deutlich überlegen ist, so trifft für den Bereich der halben MHK das Gegenteil zu (Abb. 13, Tabelle 6). Die Überlegenheit des Peak-Verlaufs in diesem Konzentrationsbereich wird noch deutlicher, wenn man ihn dem konstanten Verlauf direkt gegenüberstellt (Abb. 14).

Tabelle 6. Parameter zur Beurteilung des bakteriziden Effektes vergleichbarer Cefotiamkonzentrationen (Peak vs. konstant) gegenüber *Neisseria gonorrhoeae* (Stamm 2919/83).

Vielfaches der MHK	Peak			konstant		
	$t_{99\%}$ [h]	kn [%]	t [h]	$t_{99\%}$ [h]	kn [%]	t [h]
4 x MHK	1.97	0.0004	7.0	1.97	0.0003	8.0
1 x MHK	1.57	0.03	4.5	2.83	0.0004	8.0
½ x MHK	2.93	0.13	5.0	n.e.*	13.3	4.5

*nicht erreicht

Abb. 13. Entwicklung der Keimdicke von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß verschiedener Peakkonzentrationen von CTM. (—) 4xMHK, (----) 1xMHK, (.....) ½xMHK, (● ● ●) Kontrolle.

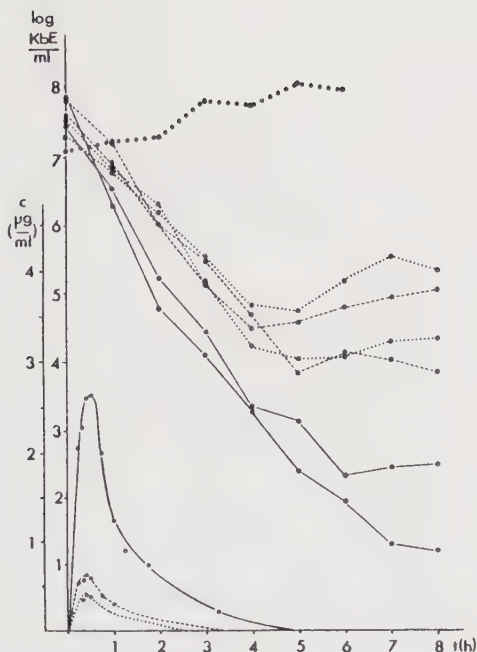
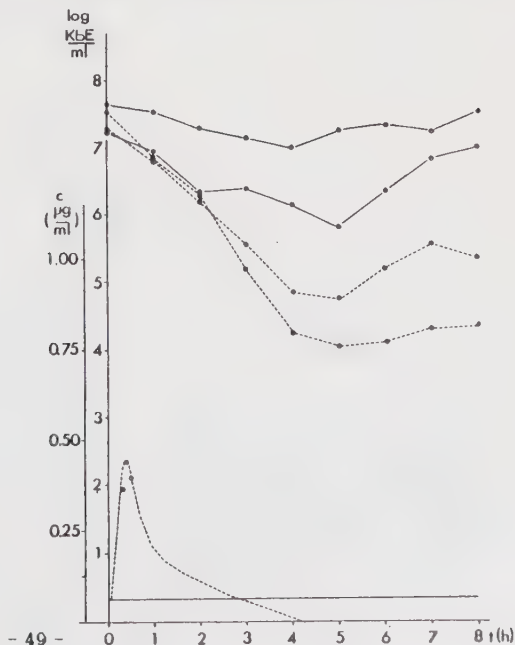


Abb. 14. Entwicklung der Keimdicke von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß von Peak-artigen (----) und konstanten (—) CTM-Konzentrationsverläufen mit einer FUK von ½xMHK.



4. 4 Gonozide Wirkung verschiedener Ceftriaxon- Plasmakonzentrationen

Die Simulation von Ceftriaxon-Plasmaspiegeln nach einmaliger intramuskulärer Injektion von 1000 bzw. 250 mg bewirkte jeweils eine starke Reduktion der Keimzahl des untersuchten Stammes von *Neisseria gonorrhoeae* (Abb. 15). Die Unterschiede zwischen beiden Dosisbereichen waren zwar nur sehr gering, die höhere Dosis aber war insgesamt etwas besser wirksam. In den niedrigeren Dosisbereichen (125, 50 und 25 mg) ergab sich ebenfalls stets ein hervorragender Dosis-Wirkungseffekt, auch wenn schrittweise von Dosis zu Dosis eine etwas geringere Bakterizidie auftrat (Abb. 16, 17, 18, 19). Auffällig war nur eine etwas stärker ausgeprägte Abnahme des bakteriziden Effektes beim Schritt von 125 mg hinab nach 50 mg (Abb. 19).

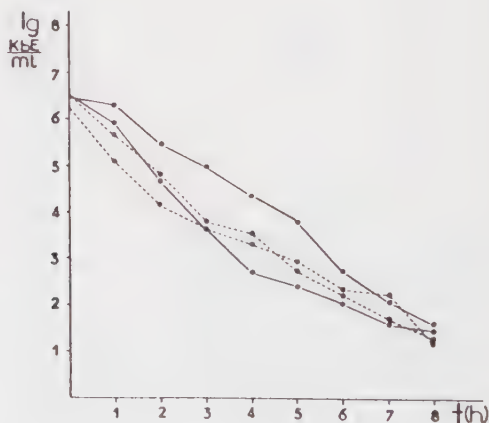


Abb. 15. Entwicklung der Keimdicke von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß simulierter CTRX-Plasmakonzentrationen nach einmaliger i.m.-Injektion von 1000 (.....) bzw. 250 mg (——).

Abb. 16. Entwicklung der Keimdichte von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß von simulierten CTRX-Plasmakonzentrationen nach einmaliger i.m.-Injektion von 125 mg.

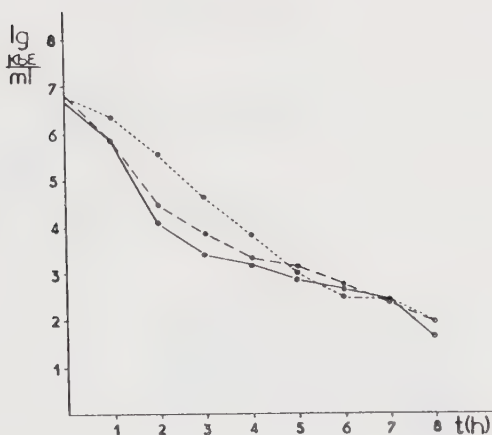


Abb. 17. Entwicklung der Keimdichte von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß von simulierten CTRX-Plasmakonzentrationen nach einmaliger i.m.-Injektion von 50 mg.

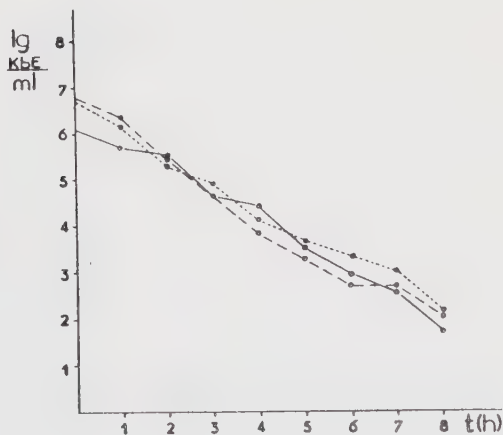


Abb. 18. Entwicklung der Keimdichte von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß von simulierten CTRX-Plasmakonzentrationen nach einmaliger i.m.-Injektion von 25 mg.

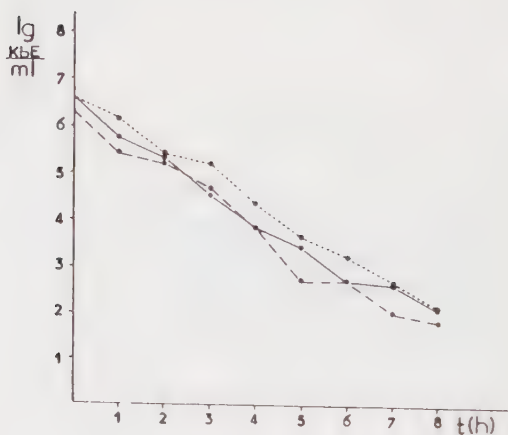
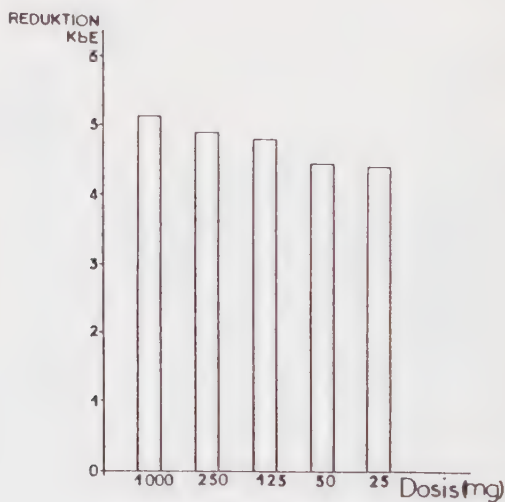


Abb. 19. Reduktion der KbE von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß von verschiedenen simulierten CTRX-Plasmakonzentrationen.



4. 5 Ergebnisse der Antibiotikumkonzentrationsbestimmung

Die in den jeweiligen Versuchen wirksamen Konzentrationen von Cefotiam sind den Abbildungen 8, 10, 12 und 13 zu entnehmen.

Die einzelnen Profile der simulierten Ceftriaxonkonzentrationen nach einmaliger intramuskulärer Gabe sind in Abb. 20 dargestellt.

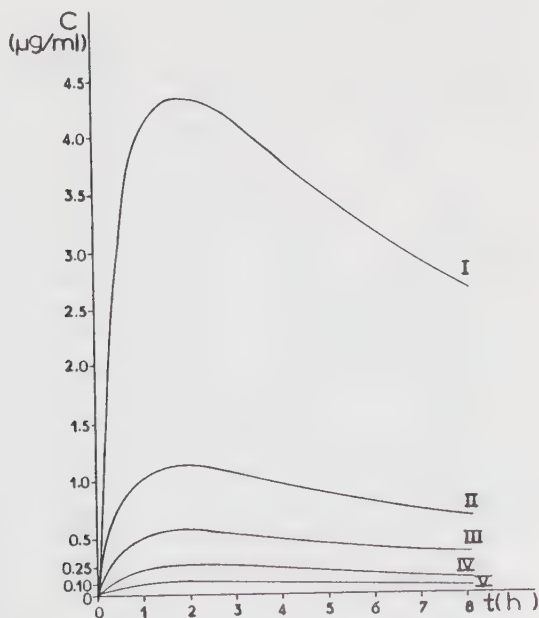


Abb. 20. In vitro simulierte Plasmaspiegel nach einmaliger i.m.-Injektion von 1000 mg (I), 250 mg (II), 125 mg (III), 50 mg (IV) und 25 mg (V) Ceftriaxon.

5 Diskussion

5. 1 Bakterizide Wirkung von Cefotiam gegenüber *Neisseria gonorrhoeae*

Auch wenn der Konzentrationszeitverlauf eines Antibiotikums während der gesamten Versuchsdauer stets hoch über der MHK des untersuchten Gonokokkenstammes liegt, so läßt sich trotzdem sagen, daß der antibiotische Effekt letztendlich vom spezifischen Konzentrationszeitverlauf abhängig ist. Dies wurde bei der Simulation der Plasma- und Hautblasenspiegel von Cefotiam deutlich. In diesen Experimenten zeigte sich, daß die Reduktion der Keimzahl dann besonders schnell erfolgte, wenn der Antibiotikumkonzentrationsverlauf sich gerade in der Phase des steilen Anstiegs zum Erreichen des Maximums befand. Je steiler der Anstieg war und je höher das Maximum lag, desto größer war der initiale gonozide Effekt (Abb. 8, 10). Das frühe Erreichen einer hohen Maximalkonzentration bei den Plasmaspiegeln (t_{max} : 69 min Plasma / 180 min KBF; c_{max} : 25.9 µg/ml Plasma / 7.5 µg/ml KBF) führt im Vergleich zu den KBF-Spiegeln zu einem wesentlich günstigeren Wert für $t_{99\%}$ (Tabelle 5). Der endgültige bakterizide Effekt, der durch den k_n -Wert repräsentiert wird, ist jedoch für die beiden simulierten CTM-Konzentrationsprofile nicht von signifikantem Unterschied (Tabelle 5). Hierbei könnte eine Korrelation mit den für beide Profile in der Größe ähnlichen FUK-Werten vorliegen (5.112 µg/ml/h Plasma / 4.114 µg/ml/h KBF), nämlich in dem Sinne, daß CTM-Spiegel mit ähnlichen FUK-Werten auch

eine ähnliche Bakterizidie gegenüber *Neisseria gonorrhoeae* hervorrufen.

Der üblicherweise zur Beurteilung der antibakteriellen Wirksamkeit herangezogene MHK-Wert scheint nach den vorliegenden Ergebnissen solange keine herausragende Rolle im Hinblick auf das Resultat der Keimreduktion zu spielen, solange der aktuelle Antibiotikumspiegel hoch über der MHK liegt. Wird diese Differenz geringer, so läßt auch der antibiotische Effekt nach. Besonders deutlich wird dies bei der Simulation der CTM-Plasmaspiegel mit dem Stamm 7291/83, einem der unempfindlichsten Repräsentanten klinischer Isolate bezogen auf den MHK-Wert (Abb. 8b, Tabelle 5). Hierbei liegt der aktuelle Antibiotikumspiegel in den letzten Stunden nur noch weniger als das Zehnfache über dem MHK-Wert. Doch kann auch der unter diesen Bedingungen erzielte bakterizide Effekt als ausreichend bezeichnet werden (kn 0.01), insbesondere wenn man das hervorragende Ergebnis (kn 0.005) des korrespondierenden KBF-Verlaufs betrachtet. Dies könnte den guten klinischen Effekt von Cefotiam bei Patienten erklären, die eine Infektion mit Keimen, welche einen relativ hohen MHK-Wert besitzen, aquiriert haben.

Die Tatsache, daß bei zwei untersuchten Gonokokkenstämmen mit verschiedenen MHK-Werten zum einen die Plasmaspiegelsimulation deutlich unterschiedliche Resultate liefert (Abb. 9), zum anderen die Simulation von Gewebsspiegeln bei beiden Stämmen ein ähnliches Ergebnisbild ergibt (Abb. 11), läßt folgende Feststellung zu: es besteht eine Notwendigkeit für die Einbeziehung der Gewebsspiegelsimulation in dynamische In vitro-Experimente zur Beurteilung der bakteriziden Wirkung von Antibiotika, nicht zuletzt auch weil das Gewebe in der Mehrzahl der Fälle den eigentlichen Ort der Infektion darstellt.

Im Hinblick auf die Gonorrhoe im speziellen erlaubt das vorliegende In vitro-Modell einen Einblick in den spezifischen Beitrag des Antibiotikums zur erfolgreichen Einmalbehandlung und darüber hinaus eine Abschätzung des potentiellen Wertes neuer Antibiotika. Im Falle des Antibiotikums Cefotiam hat die Simulation nach einmaliger intramuskulärer Gabe von 1 g in den durchgeführten Versuchen eine in hohem Maße vorhandene Eignung für die Therapie der unkomplizierten Gonorrhoe ergeben. Letzteres wurde auch schon in klinischen Studien bewiesen (44).

Da eine vollständige Eradizierung der Gonokokken in keinem Falle gelang, sollte man dies auch im menschlichen Organismus nicht vom Antibiotikum alleine verlangen. Vielmehr bedarf es zusätzlicher Abwehrmechanismen des Patienten, um im Zusammenspiel mit der antibakteriellen Wirkung des Antibiotikums die klinische Heilung herbeizuführen.

Auch wenn sich, wie oben diskutiert, gewisse Unterschiede in der gonoziden Wirkung simulierter Plasma- und KBF-Spiegel nach einmaliger i.m.-Injektion von 1 g Cefotiam ergaben, so läßt sich doch damit nicht grundsätzlich die Frage klären, ob hohe, nur für kurze Zeit anhaltende Antibiotikumspiegel oder ob niedrige kontinuierliche Spiegel in der Therapie der Gonorrhoe vorzuziehen sind. Diese Frage wird nicht nur für die Gonorrhoe im speziellen, sondern auch für bakterielle Infektionen im allgemeinen sehr kontrovers in der Literatur behandelt (4, 14, 19, 34, 36, 46, 60, 73, 75). Daher wurden ausgehend von diesem so widersprüchlich diskutierten theoretischen Ansatz versucht, durch die In vitro-Anwendung von hohen Peak-Konzentrationsverläufen und den hinsichtlich der FUK korrespondierenden kontinuierlich niedrigen Verläufen von Cefotiam gegenüber *Neisseria gonorrhoeae* eine weitergehende Klärung der Frage zu erwirken. Dabei zeigte sich, daß in den Fällen, in denen die MHK des untersuchten Stammes sehr hoch und

ausreichend lange übertroffen wird ($4 \times \text{MHK}$), der Typ des Konzentrationsverlaufs von geringerer Bedeutung ist (Abb. 12, 13). In den kritischen Konzentrationsbereichen dagegen ($1 \times \text{MHK}$, $\frac{1}{2} \times \text{MHK}$) ergeben sich offensichtliche Unterschiede dahingehend, daß im Bereich $1 \times \text{MHK}$ der konstante Verlauf einen um das 75-fache (bezogen auf k_n) und im Bereich $\frac{1}{2} \times \text{MHK}$ der Peak-Verlauf einen um das 102-fache (k_n) größeren antibakteriellen Effekt aufweist (Abb. 12, 13, 14; Tabelle 6). Dieses Phänomen mag zunächst als paradox erscheinen. Unterzieht man es jedoch einer genaueren Betrachtung, so könnte sich folgende Erklärungsmöglichkeit anbieten: in kritischen Konzentrationsbereichen ($1 \times \text{MHK}$, $\frac{1}{2} \times \text{MHK}$) ist es offenbar notwendig, daß die MHK zumindest einmal überschritten wird, wie es bei den Peak-Verläufen im niedrigsten Konzentrationsbereich ($\frac{1}{2} \times \text{MHK}$) im Gegensatz zu den kontinuierlichen Spiegeln der Fall ist. Darüber hinaus scheint es aber in einem solchen kritischen Bereich auch von Wichtigkeit zu sein, daß die MHK nach Möglichkeit nicht unterschritten wird. Dies zeigt sich vor allem im Bereich $1 \times \text{MHK}$. Während unter dem Einfluß des konstanten Konzentrationsverlaufs in diesem Bereich ein überzeugender antibakterieller Effekt auftritt - vergleichbar dem Bereich $4 \times \text{MHK}$ -, sieht dagegen die bakterizide Wirkung des hinsichtlich der FUK identischen Peak-Verlaufs weniger gut aus. Bei letzterem Konzentrationsprofil wurde die MHK des untersuchten Gonokokkenstammes schon nach 120 min unterschritten, offenbar zu früh, um einen optimalen bakteriziden Effekt zu erreichen.

Vergegenwärtigt man sich jedoch die momentane Situation der Gonorrhoe-Therapie mit den neuen Cephalosporinen und mit Cefotiam im besonderen, welche sich auf eine hervorragende Wirksamkeit sowohl in vitro als auch klinisch stützt ([44], Abschnitt 4.3), so scheint momentan der Typ des Konzentrationsverlaufs nicht von ausschlaggebender Bedeutung zu

sein. Sollte sich aber die antibakterielle Wirksamkeit des Cefotiam gegenüber *Neisseria gonorrhoeae* nach vieljährigem Einsatz in der Therapie nach unten bewegen, wie es beim Penizillin der Fall war [81], so wäre ein hoher Peak-artiger Konzentrationsverlauf, der auch im äußerst kritischen Bereich ($\frac{1}{2} \times \text{MHK}$) in zufriedenstellendem Maße bakterizid wirkt (kn 0.13), eher geeignet als ein niedriges kontinuierliches Profil.

5. 2 Gonozide Wirkung unterschiedlicher Ceftriaxon-Plasmakonzentrationen

Bevor ein neues Antibiotikum auf breiter Basis in die Therapie der Gonorrhoe eingeführt wird, muß zunächst nicht nur gezeigt werden, daß es klinisch zu mehr als 95% wirksam ist [57], sondern auch, daß die zu empfehlende Dosis möglichst nahe bei der für den Therapieerfolg nötigen Minimaldosis liegt.

Allgemein ist dabei zu beachten, daß die ideale Dosis weder zu niedrig liegen sollte, um kurzfristige Dosisanpassungen zu vermeiden - ein Fall, der bei Penizillin auftrat [13] - , noch zu hoch, um eine erhöhte Inzidenz unerwünschter Nebeneffekte zu umgehen. Im Prinzip stellen Dosisfindungsstudien, wie sie von Eichmann et al. (1981) [22] durchgeführt wurden, eine hervorragende Methode dar, um die optimale Dosis herauszufinden. Es ist heute jedoch problematisch, genügend bereitwillige Patienten für eine solche Studie zu gewinnen. Auch die bis jetzt vorgestellten Tiermodelle [2, 3, 10, 11, 12, 18, 24, 37, 63, 76] sind aus verschiedensterlei Gründen ungeeignet für die Dosisfindung in der Einmaltherapie der Gonorrhoe.

In Anbetracht dieser Situation könnte sich das Grasso-Modell als wertvolle Hilfe für die Dosisfindung erweisen. Sicherlich können die vorliegenden Ergebnisse im Moment höchstens als richtungsweisend bezeichnet werden, und es ist daher noch nicht möglich, eine endgültige und exakte Aussage bezüglich der optimalen Dosis zu treffen. Die Aussagefähigkeit würde sich aber sicherlich mit der Anzahl der untersuchten Gonokokkenstämme erhöhen. Dies ließe sich beispielsweise durch eine Computer-gesteuerte Automatisierung des Versuchsablaufs wesentlich erleichtern. Im Moment läßt sich jedoch bereits folgendes sagen: in der Studie von Eichmann et al. [22] trat der erste Therapieversager nach einmaliger i.m.-Injektion bei einer Dosis von 50 mg Ceftriaxon auf. In den vorliegenden Versuchsergebnissen zeigte sich beim Sprung von 125 mg nach 50 mg eine etwas deutlicher ausgeprägte Abnahme der antibakteriellen Wirkung von Ceftriaxon gegenüber dem untersuchten Stamm (Abb. 19). Inwieweit dieser Effekt eine Relevanz besitzt, muß in Zukunft eine Reihenuntersuchung an vielen Stämmen zeigen. Zusätzlich sollte die Wertigkeit des Modells in dieser Frage durch eine vor der klinischen Dosisfindung stattfindende prospektive Dosisfindung im Modell erwiesen werden.

Letztendlich sollten die hier durchgeführten Experimente also nur ein erster grundsätzlicher Schritt in eine neue Richtung sein, nämlich die vorgezogene Dosisfindung im Modell. Falls man jetzt schon irgendwelche Schlüsse für die Zukunft ziehen wollte, so sähen diese folgendermaßen aus: wenn ein neues Antibiotikum aufgrund seiner MHK-Werte und seiner pharmakokinetischen Eigenschaften für die Therapie der Gonorrhoe geeignet erschiene, so sollten verschiedenste Dosen dieser Substanz in dem hier präsentierten In vitro-Modell getestet werden und derjenige Dosisbereich für die klinische Untersuchung herangezogen werden, in dem es zu einer mehr oder

weniger ausgeprägten Abnahme des bakteriziden Effektes bei mindestens einem untersuchten Stamm kommt. Dadurch ergab sich dann der Vorteil, daß klinische Dosisfindungsstudien in ihrem Umfang wesentlich reduziert werden könnten.

Die Einmalbehandlung wird heute bei der unkomplizierten Gonorrhoe bevorzugt. Aus mancherlei Gründen erscheinen neue Cephalosporine wie Cefotiam und Ceftriaxon dabei besonders wirksam.

Um ihre Wirkungsweise besser zu verstehen, wurde das In vitro-Modell nach Grasso herangezogen, das es erlaubte, das Wachstumsverhalten von *Neisseria gonorrhoeae* in der Flüssigphase in Gegenwart ständig wechselnder Antibiotikumkanzentrationen zu untersuchen. Zu Grunde gelegt wurden zum einen die zuvor ermittelten Plasma- und Kantharidinblasenflüssigkeitsspiegel bei Probanden nach einmaliger intramuskulärer Gabe von 1 g Cefotiam. Letztere Konzentrationen standen für den nicht meßbaren Wirkstoffgehalt am Infektionsort. Für diese Untersuchungen wurden zwei verschiedene Gonokokkenstämme mit unterschiedlicher MHK eingesetzt, die die Extreme der MHK-Verteilung klinischer Isolate repräsentierten. Während das Ausmaß des gonoziden Effektes bei der Plasmaspiegelsimulation den unterschiedlichen MHK-Werten entsprach, kam es dagegen bei der Gewebsspiegelsimulation zu einer Abnahme der Bakteriendichte, die unabhängig von den MHK-Werten war. Eine vollständige Abtötung der Gonokokken wurde zwar in keinem Versuch erreicht, insgesamt gesehen jedoch kann die bakterizide Wirkung in beiden Experimenttypen als sehr gut bezeichnet werden. Diese Resultate unterstreichen deutlich die Notwendigkeit für die Einbeziehung der Gewebsspiegelsimulation in dynamische In vitro-Untersuchungen.

Zum anderen wurden ebenfalls mit Cefotiam Experimente durchgeführt, die der Frage nachgehen sollten, ob niedrige kontinuierliche Spiegel oder ob hinsichtlich der Fläche unter

der Kurve (FUK) korrespondierende hohe kurzanhaltende Spitzenspiegel für die Therapie der Gonorrhoe vorzuziehen sind. Dabei haben sich im Bereich $\frac{1}{2}$ xMHK die Peak-artigen Spiegel, im Bereich 1xMHK dagegen die kontinuierlichen Spiegel als besser wirksam erwiesen. Für die Therapie der Gonorrhoe folgt daraus, daß innerhalb der ersten 8 Stunden die MHK überhaupt nicht unterschritten werden sollte. Wäre dies aufgrund eines sehr unempfindlichen Stammes doch einmal der Fall, so müßten hohe Spitzenspiegel bevorzugt werden.

Schließlich sollte noch eine praktische Einsatzmöglichkeit des verwendeten In vitro-Modells geprüft werden. Zu diesem Zweck wurde ein Gonokokkenstamm ständig wechselnden Konzentrationen von Ceftriaxon ausgesetzt, wie sie nach einmaliger intramuskulärer Injektion verschiedener Dosen am Menschen gefunden wurden (1000, 250, 125, 50 und 25 mg). Dabei nahm der bakterizide Effekt von Dosis zu Dosis schrittweise ab. Nur der Schritt von 125 mg nach 50 mg war etwas stärker ausgeprägt, was insgesamt gut mit früheren klinischen Dosisfindungsstudien übereinstimmte. Somit konnte das hier präsentierte In vitro-Modell für die Therapie der Gonorrhoe sowohl in der Vorhersage der optimalen Dosis als auch der klinischen Wirksamkeit eines neuen Antibiotikums wertvolle Dienste leisten.

7 Literaturverzeichnis

1. Al-Asadi MJS, Greenwood D, O'Grady F (1979) In vitro model simulating the form of exposure of bacteria to antimicrobial drugs encountered in infection. Antimicrob Agents Chemother 16: 77 - 80
2. Arko RJ (1972) *Neisseria gonorrhoeae*: Experimental infection of experimental animals. Science 177: 1200
3. Arko RJ, Duncan WA, Brown WJ, Peacock WL, Tomizawa T (1976) Immunity in infection with *Neisseria gonorrhoeae* and serological response in the chimpanzee. J Infect Dis 133: 441 - 447
4. Barza M (1981) Principles of tissue penetration of antibiotics. J Antimicrob Chemother [suppl C] 8: 7 - 28
5. Bergen T, Carlsen IB (1980) Bacterial kill rates of amoxicillin at exponentially diminishing concentrations simulating in vivo conditions. Infection [suppl 1] 8: 103 - 108
6. Bergen T, Carlsen IB, Fuglesang JE (1980) An in vitro model for monitoring bacterial responses to antibiotic agents under simulated in vivo conditions. Infection [suppl 1] 8: 96 - 102
7. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH (1984) Dermatologie und Venerologie. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, S 53 - 66
8. Brookes R, Heden CG (1967) Dense cultures of *Neisseria gonorrhoeae* in liquid medium. Appl Microbiol 15: 219 - 223
9. Brown J, Biddle T, Warnnissorn T, Panikabutra K, Traisupa A (1982) Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in

- Bangkok: Is single-drug treatment passé? Lancet 2: 1366 - 1368
10. Buchanan TM, Gotschlich EC (1973) Studies on gonococcus infection: III. Correlation of gonococcal colony morphology with infectivity for the chick embryo. J Exp Med 137: 196
 11. Bumgarner LR, Finkelstein RA (1973) Pathogenesis and immunology of experimental gonococcal infection: Virulence of colony types of *Neisseria gonorrhoeae* for chicken embryos. Infect Immun 8: 919 - 924
 12. Corbell LB, Wunderlich AC, Corbell RR, McCutchan JA, Ito Jr I, Braude AI (1979) Disseminated gonococcal infection in mice. Infect Immun 26: 984
 13. Culliton BJ (1976) Penicillin-resistant gonorrhea: New strains spreading worldwide. Science 194: 1395 - 1397
 14. Curtis FR, Wilkinson AE (1958) A comparison of the in vitro sensitivity of gonococci to penicillin with the results of treatment. Brit J Vener Dis 34: 70 - 82
 15. Delsignore R, Baroni CM, Crotti G, Mineo F, Butturini U, Ascalone V, Cisternino M (1983) Absolute bioavailability of ceftriaxone after intramuscular administration to healthy volunteers. Chemotherapy 29: 157 - 162
 16. Drews G (1976) Mikrobiologisches Praktikum. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 106 - 123, 140 - 149
 17. Drugeon HB, Maurisset B, Courtieu AL (1979) Bactéricidie des aminosides dans un système statique et dans un modèle dynamique. Nouvelle Presse Médicale 8: 3403 - 3407
 18. Drutz DJ (1978) Hematogenous gonococcal infections in rabbits and dogs. In: Brooks GF et al. (Eds) Immunobiology of *Neisseria gonorrhoeae*. American Society for Microbiology, Washington, p 307
 19. Eagle H, Fleischman R, Levy M (1953) "Continuous" vs. "discontinuous" therapy with penicillin. The effect of the

- interval between injections on therapeutic efficacy. *New Engl J Med* 248: 481 - 488
20. Eagle H, Musselman AD (1948) The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. *J Exp Med* 88: 99 - 131
 21. Eichmann A (1983) Penizillinresistenz der Gonorrhoe in Europa. *Hautarzt* 34: 537 - 538
 22. Eichmann A, Weidmann G, Havas L (1981) One-dose treatment of acute uncomplicated gonorrhoea of male patients with ceftriaxone Ro 13-9904, a new parenteral cephalosporin. A dose-range finding pilot study using doses of 500, 250, 125 and 50 mg respectively, in descending order. *Chemotherapy [suppl 1]* 27: 62 - 69
 23. Faruki H, Kohmescher RN, McKinney D, Sparling PF (1985) A community based outbreak of infection with penicillin resistant *Neisseria gonorrhoeae* not producing penicillinase (chromosomally mediated resistance). *N Engl J Med* 313: 607
 24. Foster RS, Vinson JW (1977) Chicken embryo as an animal model for gonorrhoea. *Infect Immun* 16: 568
 25. Giamarellou H, Pouloupoulos P, Katsabas A, Petrikos G, Papapetropoulou M, Daikos GK (1981) Antibacterial activity of Ro 13-9904 and preliminary experience in gonorrhoea and chronic urinary tract infections. *Chemotherapy [suppl 1]* 27: 70 - 74
 26. Gladtko E, von Hattingberg HM (1977) *Pharmakokinetik*. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 40 - 49, 133 - 153
 27. Grasso S (1985) Historical review of in-vitro models. *J Antimicrob Chemother [suppl A]* 15: 99 - 102
 28. Grasso S, Meinardi G, de Carneri I, Tamassia V (1978) New in vitro model to study the effect of antibiotic

- concentration and rate of elimination on antibacterial activity. Antimicrob Agents Chemother 13: 570 - 576
29. Greenwood D, O'Grady F (1978) An in vitro model of the urinary bladder. J Antimicrob Chemother 4: 113 - 120
 30. Haag R (1985) Post-MIC effect of fosfomycin on *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in experimentally infected mice. J Antimicrob Chemother [supplA] 15: 265 - 271
 31. Hafiz S, McEntegart MG (1976) Prolonged survival of *Neisseria gonorrhoeae* in a new liquid medium. Br J Vener Dis 52: 381 - 383
 32. Handsfield HH, Murphy VL, Holmes KK (1981) Dose-ranging study of ceftriaxone for uncomplicated gonorrhea in men. Antimicrob Agents Chemother 20: 839 - 840
 33. von Hattingberg HM, Brockmeier D, Kreuter G (1977) A rotating iterative procedure (RIP) for estimating hybrid constants in multicompartment analysis on desk computers. Eur J Clin Pharmacol 11: 381 - 388
 34. Jaffe HW, Schroeter AL, Reynolds GH, Zaidi AA, Martin Jr JE, Thayer JD (1979) Pharmacokinetic determinants of penicillin cure of gonococcal urethritis. Antimicrob Agents Chemother 15: 587 - 591
 35. Judson FN, Ehret JM, Root CJ (1983) Comparative study of ceftriaxone and aqueous procaine penicillin G in the treatment of uncomplicated gonorrhea in women. Antimicrob Agents Chemother 23: 218 - 220
 36. Kandhari KC, Pasricha JS, Bhargava NC, Sharma AK, Singh OP, Sood P, Bhujwala RA (1975) Penicillic therapy in gonorrhea: correlation of in vitro resistance of *N. gonorrhoeae* strains with clinical response to penicillin and its blood levels. Indian J Med Res 63: 818 - 823
 37. Kaspar RL, Drutz DJ (1977) Perihepatitis and hepatitis as complications of experimental endocarditis due to *Neisseria gonorrhoeae* in the rabbit. J Infect Dis 136: 37

38. Kaufman RE, Johnson RE, Jaffe HW, Thornsberry C, Reynolds GH, Wiesner PJ and the Cooperative Study Group (1976) National gonorrhea monitoring study. Treatment results. *N Engl J Med* 294: 1 - 4
39. Klaus U, Henninger W, Jacobi P, Wiedemann B (1981) Bacterial elimination and therapeutic effectiveness under different schedules of amoxicillin administration. *Chemotherapy* 27: 200 - 208
40. Klein P (1957) *Bakteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis*. Springer, Berlin Göttingen Heidelberg
41. Korting HC (1984) In vitro susceptibility of recent isolates of *Neisseria gonorrhoeae* to cephalosporins of different generations and Penicillin G: A comparative evaluation. *Dermatologica* 168: 67 - 72
42. Korting HC (1984) Plasma and skin blister fluid levels of cefotiam and cefmenoxime after single intramuscular application of 1 g in gonorrhoea. *Chemotherapy* 30: 277 - 282
43. Korting HC, Neubert U (1984) Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to ceftizoxime in vitro and in vivo. *Chemotherapy* 30: 322 - 327
44. Korting HC, Neubert U (1985) Treatment of gonorrhoea with cefotiam: activity in vitro and clinical results of a 1 g single dose regimen. *Dermatologica* 171: 264 - 268
45. Korting HC, Schaefer-Korting M, Haag R, Mutschler E (1984) Plasma, cantherides blister fluid, and suction blister fluid levels of ceftizoxime after single intramuscular application for gonorrhoea. *Int J Clin Pharm Ther Tox* 22: 218 - 220
46. Krook G, Juhlin I (1965) Problems in diagnosis, treatment and control of gonorrheal infections. IV. The correlation between the dose of penicillin, concentration in blood,

- IC₅₀-values of gonococci and results of treatment. Acta Derm-Venereol 45: 242 - 253
47. Lucas JB, Thayer JD, Utley PM, Billings TE, Hackney JF (1966) Cephalothin therapy in male gonorrhoea. Antimicrob Agents Chemother 1: 686 - 688
 48. Meade III RH (1970) Gonorrhea: the minimum effective dose. New Eng J Med 283: 42 - 43
 49. Morse SA, Vaughan P, Johnson D, Iglewski BH (1976) Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by a bacteriocin from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 10: 354 - 362
 50. Murakawa T, Sakamoto H, Hirose T, Nishida M (1980) New in vitro kinetic model for evaluating bactericidal efficacy of antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 18: 377 - 381
 51. Nishida M, Murakawa T, Kamimura T, Okada N (1978) Bactericidal activity of cephalosporins in an in vitro model simulating serum levels. Antimicrob Agents Chemother 14: 6 - 12
 52. Nishida M, Murakawa T, Kamimura T, Okada N, Sakamoto H, Fukada S, Nakamodo S, Yokota Y, Miki K (1976) Laboratory evaluation of FR10612, a new oral cephalosporin derivative. J Antibiot 29: 444 - 459
 53. O'Grady F, Pennington JH (1966) Bacterial growth in an in vitro system simulating conditions in the urinary bladder. Brit J Exper Pathol 47: 152 -157
 54. Petzold D (1980) Gonorrhoe. In: Korting GW (Hrsg) Dermatologie in Praxis und Klinik, Bd III. Thieme, Stuttgart, S 44.3 - 44.16
 55. Phillips I (1976) β -lactamase-producing, penicillin-resistant gonococcus. Lancet 2: 656 - 657
 56. Pothier P, Kazmierczak A, Sieber E, Gaillard MC, Pechinot A (1981) Activit  bact ricide de l'amoxicilline et du cefaclor in vitro en fonction de la variation des

- concentrations sériques d'antibiotique observées chez l'homme. *Ann Microbiol (Inst Pasteur)* 132 A: 293 - 306
57. Rein MF (1981) Therapeutic decisions in the treatment of sexually transmitted diseases: An overview. *Sex Transm Dis [suppl]* 8: 93 - 99
58. Reiner R (1982) Antibiotics. An introduction. Thieme, Stuttgart New York, S 9 - 109
59. Rowe EL, Morozowich W (1969) A simple dilution analog computer for simulation of drug distribution processes. *J Pharm Sci* 58: 1375 - 1378
60. Sabath LD, Kivlahan JJ (1961) Dosage of penicillin for acute gonorrhea of males. *Am J Med Sci* 240: 663 - 673
61. Sanfilippo A, Morvillo E (1968) An experimental model for the study of the antibacterial activity of the sulfonamides. *Chemotherapy* 13: 54 - 60
62. Schäfer-Korting M, Korting HC, Hiemstra S, Mutschler E (1982) Does cantharides blister fluid provide access to the peripheral compartment? *Eur J Clin Pharmacol* 23: 327 - 330
63. Scheld WM, Tauber MG, Zak O, Sande MA (1985) The influence of dosing schedules and cerebrospinal fluid bactericidal activity in the therapy of bacterial meningitis. *J Antimicrob Chemother [suppl A]* 15: 303 - 312
64. Seeberg AH, Wiedemann B (1985) Application of in-vitro models: development of resistance. *J Antimicrob Chemother [suppl A]* 15: 241 - 249
65. Shah PM (1980) An improved method to study antibacterial activity of antibiotics in an in vitro model simulating serum levels. *Meth Find Exper Clin Pharmac* 4: 171 - 176
66. Shah PM (1981) Bactericidal activity of ampicillin and amoxicillin. *J Antimicrob Chemother [suppl C]* 8: 93 - 99
67. Shah PM (1983) In vitro activity of cefotetan, other beta-lactams and netilmicin. *J Antimicrob Chemother [suppl A]* 11: 73 - 78

68. Shah PM, Pütz H, Ruhstrat N, Ritz N, Stille W (1982) Bakterizide Aktivität von kontinuierlich abfallenden Cephalosporin-Konzentrationen. Fortschr Antimikr Antineoplast Chemother 1: 67 - 71
69. Shelton S, Nelson JD, McCracken Jr GH (1980) In vitro susceptibility of gram-negative bacilli from pediatric patients to moxalactam, cefotaxime, Ro 13-9904, and other cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 18: 476 - 479
70. Simon C, Stille W (1982) Antibiotikatherapie in Klinik und Praxis. Schattauer, Stuttgart New York, S 67 - 96, 414 - 417
71. Sous H, Hirsch I (1982) Antibakterielle Aktivität einiger neuer Cephalosporine im Grasso-Modell und an der infizierten Maus. Fortschr Antimikr Antineoplast Chemother 1: 85 - 90
72. Sous H, Hirsch I (1985) Bactericidal activity of phenoxymethylpenicillin in an in-vitro model simulating tissue kinetics. J Antimicrob Chemother [suppl A] 15: 223 - 239
73. Staheli LT (1964) Duration of therapy in management of gonorrhea. J Am Med Ass 190: 118 - 119
74. Thabaut A, Durosier JL, Saliou P (1981) Study of the in vitro activity of new cephalosporins on 109 strains of *Neisseria gonorrhoeae* and 60 strains of *Neisseria meningitidis*. Chemotherapy [suppl 1] 27: 19 - 24
75. Thys JP, Klastersky J, Mombelli G (1981) Peak or sustained antibiotic serum levels for optimal tissue penetration. J Antimicrob Chemother [suppl C] 8: 29 - 36
76. Vedros NA, Kenyon J (1978) Mouse model for the study of gonococcal infection. In: Brooks GF et al. (eds) Immunobiology of *Neisseria gonorrhoeae*. American Society for Microbiology, Washington, p 314

77. White AR, Stokes DH, Slocombe B, Sutherland R (1985) Bactericidal effects of amoxicillin/clavulanic acid and ticarcillin/clavulanic acid in in-vitro kinetic models. J Antimicrob Chemother [suppl A] 15: 227 - 232
78. White CA, Toothaker RD (1985) Influence of ampicillin elimination half-life on in-vitro bactericidal effects. J Antimicrob Chemother [suppl A] 15: 257 - 260
79. Wiedemann B (1980) Microbiological basis of antibiotic therapy. Infection [suppl 1] 8: 6 -13
80. Wiedemann B, Seeberg AH (1984) The activity of cefotiam on β -lactamase-producing bacteria in an in-vitro model. J Antimicrob Chemother 13: 111 - 119
81. Willcox RR (1970) A survey of problems in the antibiotic treatment of gonorrhoea. With special reference to South-East Asia. Brit J Vener Dis 46: 217 - 242
82. Yoshikawa TT, Shibata SA, Herbert P, Oill PA (1980) In vitro activity of Ro 13-9904, cefuroxime, cefoxitin, and ampicillin against *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob Agents Chemother 18: 355 - 356
83. Zajdowicz TR, Sanches PL, Berg SW, Kerbs SBJ, Newquist RL, Harrison WO (1983) Comparison of ceftriaxone with cefoxitin in the treatment of penicillin-resistant gonococcal urethritis. Brit J Vener Dis 59: 176 - 178
84. Zinner SH, Husson M, Klastersky J (1981) An artificial capillary in vitro kinetic model of antibiotic bactericidal activity. J Infect Dis 144: 583 - 587

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco danke ich für die Überlassung des vorliegenden Themas und für die Möglichkeit, die damit verbundenen Untersuchungen am Bakteriologischen Labor der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchführen zu dürfen.

Darüber hinaus gilt mein ganz besonderer Dank Herrn PD Dr. med. H.C. Korting für seine freundliche Unterstützung und stets lehrreiche Beratung.

Des weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Schäfer-Korting vom Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main, für die eingehende Diskussion pharmakokinetischer Aspekte bedanken.

Schließlich danke ich auch den medizinisch-technischen Assistentinnen des Bakteriologischen Labors für ihre Mithilfe bei technischen Fragen und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Am 27. November 1960 wurde ich in Forchheim (Oberfranken) als erstes von drei Kindern der Eheleute Wolfgang und Sonja Ollert, derzeit wohnhaft in 8111 Saulgrub, Wetzsteinweg 3, geboren.

Von 1967 bis 1971 besuchte ich die Grundschule in Altenau, Gemeinde Saulgrub, im Landkreis Garmisch-Partenkirchen.

Im Jahre 1971 wechselte ich dann als externer Schüler auf das Benediktinergymnasium in Ettal über, an dem ich im Juni des Jahres 1980 die allgemeine Hochschulreife erwarb.

Im November desselben Jahres Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, wobei ich während der gesamten Studiendauer durch ein Stipendium nach dem Bayerischen Begabtenförderungsgesetz unterstützt wurde. An der selbigen Universität legte ich 1982 das Physikum, sowie in den Jahren 1983 und 1986 die ersten beiden Abschnitte der Ärztlichen Prüfung ab.

Die einzelnen Tertiale des Praktischen Jahres absolvierte ich wie folgt: Dermatologie an der Dermatologischen Klinik der LMU, Innere Medizin an der II. Medizinischen Klinik im Klinikum Großhadern der LMU, sowie Chirurgie an der Universität von Texas in San Antonio, USA.

Die beiden Teile des III. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung schließlich legte ich im April des Jahres 1987 ab. Anfang Juni 1987 erhielt ich die Approbation als Arzt.

Mit den Untersuchungen, die meiner Promotion zugrunde liegen, begann ich im Dezember 1983 an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1. Zur In vitro-Untersuchung herangezogene Gonokokkenstämme mit dem für die einzelnen Experimenttypen maßgebenden MHK-Werten (Typ I: CTM Plasma/Gewebe; Typ II: CTM konstant/Peak; Typ III: CTRX).

Tabelle 2. Wichtige pharmakokinetische Daten zur In vitro-Simulation von Plasma- und Kantharidinblasenflüssigkeitspiegeln (KBF) nach einmaliger i.m.-Injektion von 1 g Cefotiam.

Tabelle 3. Wichtige Parameter zur In vitro-Untersuchung des bakteriziden Effekts verschiedener Cefotiam-Konzentrationsprofile mit jeweils identischer FUK gegenüber *Neisseria gonorrhoeae*.

Tabelle 4. Wichtige Parameter für die In vitro-Simulation von Konzentrationsverläufen nach einmaliger i.m.-Injektion verschiedener Ceftriaxon-Dosen.

Tabelle 5. Parameter zur Beurteilung des bakteriziden Effektes von Plasma- und Gewebsspiegeln des Antibiotikums Cefotiam gegenüber Stämmen von *Neisseria gonorrhoeae* mit unterschiedlichen MHK-Werten.

Tabelle 6. Parameter zur Beurteilung des bakteriziden Effektes vergleichbarer Cefotiam-Konzentrationen (Peak vs. konstant) gegenüber *Neisseria gonorrhoeae* ($t_{0.5}$, kn, t).

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1. Offenes pharmakokinetisches Einkompartimentmodell mit Eingangskompartiment B und zentralen Kompartiment A (k_a : Absorptionskonstante; k_e : Eliminationskonstante).

Abb. 2. Graphische Darstellung der reinen Invasion (I), der reinen Elimination (II) und der Bateman-Funktion (III) bei gleichzeitig stattfindender Invasion und Elimination.

Abb. 3. Strukturformel von Cefotiam.

Abb. 4. Strukturformel von Ceftriaxon.

Abb. 5. Skizze der verwendeten Versuchsanordnung (Kulturgefäß A, Antibiotikumgefäß B, Vorratsgefäß R, Sammelgefäß S, Thermostat T, Magnetmotor M, Pumpe P, Filter F).

Abb. 6. Vergleich zwischen Membranfiltrationsmethode (MF) und Trübungsmessung (TM) in der Erfassung des Wachstumsverhaltens des Gonokokkenstammes 7291/83 unter statischen (MF X—X; TM X·····X) bzw. dynamischen (MF ●——●; TM ●····●) Bedingungen.

Abb. 7. Entwicklung der Keimdichte der Gonokokkenstämme 2919/83 (X) und 3067/83 (●) ohne Zusatz von Antibiotikum unter statischen (·····) und dynamischen (——) Bedingungen.

Abb. 8. Entwicklung der Keimdichte von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß simulierter CTM-Plasmaspiegel. a. Stamm 3067/83. b. Stamm 7291/83.

Abb. 9. Entwicklung der Keimdichte von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß simulierter CTM-Plasmaspiegel (Mittelwert-Kurven). (——) Stamm 3067/83, (· · · · ·) Stamm 7291/83.

Abb. 10. Entwicklung der Keimdichte von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß simulierter CTM-KBF-Spiegel. **a.** Stamm 3067/83. **b.** Stamm 7291/83.

Abb. 11. Entwicklung der Keimdichte von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß simulierter CTM-KBF-Spiegel (Mittelwert-Kurven). (——) Stamm 3067/83, (· · · · ·) Stamm 7291/83.

Abb. 12. Entwicklung der Keimdichte von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß verschiedener konstanter CTM-Konzentrationen. (——) 4xMHK, (-----) 1xMHK, (· · · · ·) ½xMHK, (● ● ● ●) Kontrolle.

Abb. 13. Entwicklung der Keimdichte von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß verschiedener Peakkonzentrationen von CTM. (——) 4xMHK, (-----) 1xMHK, (· · · · ·) ½xMHK, (■ ● ● ●) Kontrolle.

Abb. 14. Entwicklung der Keimdichte von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß von Peak-artigen (-----) und konstanten (——) CTM-Konzentrationsverläufen mit einer FUK von ½xMHK.

Abb. 15. Entwicklung der Keimdichte von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß simulierter CTRX-Plasmakonzentrationen nach einmaliger i.m.-Injektion von 1000 (· · · · ·) bzw. 250 mg (——).

Abb. 16. Entwicklung der Keimdichte von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß von simulierten CTRX-Plasmakonzentrationen nach einmaliger i.m.-Injektion von 125 mg.

Abb. 17. Entwicklung der Keimdicke von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß von simulierten CTRX-Plasmakonzentrationen nach einmaliger i.m.-Injektion von 50 mg.

Abb. 18. Entwicklung der Keimdicke von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß von simulierten CTRX-Plasmakonzentrationen nach einmaliger i.m.-Injektion von 25 mg.

Abb. 19. Reduktion der KbE von *Neisseria gonorrhoeae* unter dem Einfluß von verschiedenen simulierten CTRX-Plasmakonzentrationen.

Abb. 20. In vitro simulierte Plasmaspiegel nach einmaliger i.m.-Injektion von 1000 mg (I), 250 mg (II), 125 mg (III), 50 mg (IV) und 25 mg (V) Ceftriaxon.

